

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELE FRANCO SCARANTE

ALTERAÇÕES NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS A ESTÍMULO MECÂNICO
E AO FRIO EM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO
CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS: ENVOLVIMENTO DOS
RECEPTORES TRPA1 E TRPM8

CURITIBA

2015

ALTERAÇÕES NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS A ESTÍMULO MECÂNICO E A FRIO EM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA
PELA CONSTRIÇÃO CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS: ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES TRPM8 E TRPA1

2015

FRANCIELE FRANCO SCARANTE

ALTERAÇÕES NAS RESPOSTAS NOCICEPTIVAS A ESTÍMULO MECÂNICO
E AO FRIO EM DOR NEUROPÁTICA INDUZIDA PELA CONSTRIÇÃO
CRÔNICA DO NERVO CIÁTICO EM RATOS: ENVOLVIMENTO DOS
RECEPTORES TRPA1 E TRPM8

Trabalho apresentado como requisito
parcial à obtenção do grau de Bacharel
em Biomedicina no curso de
graduação em Biomedicina, Setor
de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª Drª Joice Maria da Cunha

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha, por me apoiar e orientar não só durante o último ano, mas desde que ingressei no laboratório de Farmacologia da Dor da UFPR. Obrigada por me guiar nesses primeiros passos da minha caminhada científica.

Ao grupo do Laboratório de Farmacologia da Dor pelo apoio e conselhos e especialmente a Anne Karoline Schreiber e Carlos Henrique Alves Jesus pela cooperação.

Aos ratos utilizados durante esse projeto. Sem eles esse estudo não seria possível.

Às minhas amigas, Camila Pasquini de Souza e Kelin Gonçalves de Oliveira, por escutarem minhas reclamações inconvenientes e sempre me apoiarem para seguir em frente.

À minha família, pela compreensão e apoio incondicional.

RESUMO

A possível ação de TRPA1 como um mecanossensor e a caracterização de TRPM8 com um termossensor de frio tornam esses receptores potenciais atuantes nas manifestações de alodinia mecânica e hipersensibilidade ao frio em dor neuropática. Dessa forma, esse estudo propõe a avaliação do papel desses receptores nas alterações na percepção mecânica e de estímulos frios em um modelo animal de dor neuropática. Para isso, o modelo CCI foi utilizado para indução de neuropatia em ratos Wistar, utilizando como controle um grupo falso-operado (Sham). O teste Von Frey eletrônico mostrou que os animais do grupo CCI manifestaram uma alodinia mecânica que foi evidenciada logo no 4º dia pós-cirurgia e persistiu por pelo menos quatro semanas. De forma semelhante, os animais CCI manifestaram uma hipersensibilidade ao frio nos testes de placa fria e instilação de acetona. Houve, ainda, uma alteração na temperatura limiar reconhecida como nociva nos animais CCI em comparação ao grupo Sham. A aplicação do agonista TRPA1, óleo de mostarda (MO, 50 µL, i.pl., 0,1%, 0,5% ou 1%) induziu uma resposta nociceptiva direta exacerbada no grupo com neuropatia. Essa ativação de TRPA1 através da aplicação de MO reduziu significativamente o limiar mecânico de ambos os grupos. Além disso, o bloqueio de TRPA1 pelo antagonista HC030031 atenuou significativamente a alodinia mecânica dos ratos CCI. Quanto ao canal TRPM8, a resposta induzida pela administração intraplantar do agonista mentol (MT, 50 µL, 0,1%, 0,5% ou 1%) não foi significativamente diferente entre os animais dos grupos CCI e Sham. A ativação de TRPM8 por MT aumentou significativamente a latência de retirada da pata dos animais Sham no teste da placa fria, mas não teve efeito sobre a resposta do grupo CCI. Ademais, o bloqueio de TRPM8 por seu antagonista AMTB não alterou a resposta dos ratos CCI no teste da placa fria. Os resultados aqui apresentados indicam um importante papel do receptor TRPA1 na fisiopatologia da alodinia mecânica, enquanto a manipulação farmacológica de TRPM8 não trouxe indícios para a associação entre esse canal e as manifestações de hipersensibilidade ao frio.

Palavras-chave: dor neuropática, alodinia mecânica, hipersensibilidade ao frio, TRPM8, TRPA1.

ABSTRACT

The proposed action of TRPA1 as a mechanosensor and the characterization of TRPM8 as a cold thermosensor raise the question of whether these receptors are implicated in mechanical allodynia and cold hyperalgesia in neuropathic pain. Hence, this study proposes the investigation of the roles of these receptors on the alteration of the mechanical and cold perception in an animal model of neuropathic pain. In order to assess that, the neuropathy was induced through the chronic constriction injury of the sciatic nerve (CCI) in Wistar rats, using a sham group for control purposes. The electronic Von Frey test showed that the CCI group presented a mechanical allodynia that was firstly evidenced on the 4th day after surgery, remaining for at least 4 weeks. Similarly, the CCI rats displayed a cold hypersensitivity as revealed by the cold plate and acetone tests. Moreover, the CCI animals exhibited an alteration of the cold thermal threshold, as they were abnormally sensible to a temperature recognized as innocuous by the Sham group. The intraplantar injection of the TRPA1 agonist, mustard oil (MO, 50 μ L, 0.1%, 0.5% or 1%), induced a nociceptive response exacerbated on the CCI compared to the Sham group. This activation of TRPA1 by MO decreased the mechanical threshold of both groups, CCI and Sham. Furthermore, the pharmacological blockade of TRPA1 through the intraplantar injection of the antagonist HC030031 attenuated the mechanical allodynia of the animals with neuropathy. Concerning on the TRPM8 channel, the response induced by the intraplantar administration of the agonist menthol (MT, 50 μ L, 0.1%, 0.5% or 1%) was not statistically significant between the CCI and Sham group. This activation of TRPM8 reduced the latency of response of the Sham group on the cold plate test, whereas it had no effect on the CCI group. Besides, the TRPM8 antagonist AMTB had no effect on the response of the CCI rats on the cold plate test. These results indicate an important role of the TRPA1 receptor on the pathophysiology of mechanical allodynia, while the pharmacological manipulation of TRPM8 channel did not bring evidence for an association between this receptor and cold hypersensitivity.

Key-words: neuropathic pain, mechanical allodynia, cold hypersensitivity, TRPM8, TRPA1.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	07
2.	OBJETIVOS.....	17
	2.1 Objetivo Geral.....	17
	2.2 Objetivos Específicos.....	17
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
	3.1 Animais.....	18
	3.2 Cirurgia para indução de dor neuropática.....	18
	3.3 Testes comportamentais.....	19
	3.3.1 Avaliação da sensibilidade térmica ao frio.....	19
	3.3.2 Avaliação da sensibilidade mecânica.....	20
	3.3.3 Efeito da ativação dos receptores.....	20
	3.3.4 Inibição dos receptores.....	21
	3.4 Análise estatística.....	21
4.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	21
	4.1 Experimento 1.....	21
	4.2 Experimento 2.....	22
5.	RESULTADOS.....	23
	5.1 Alterações nociceptivas decorrentes da injúria por constrição crônica do nervo ciático.....	23
	5.2 Sensibilidade do receptor TRPA1.....	26
	5.3 TRPA1 e sensibilidade mecânica.....	27
	5.4 Sensibilidade do receptor TRPM8.....	29
	5.5 TRPM8 e sensibilidade ao frio.....	29
6.	DISCUSSÃO.....	31
7.	CONCLUSÕES.....	42
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

“Se eu pudesse, pegava a dor, colocava a dor dentro de um envelope e devolvia ao remetente” (Mário Quintana). Muitos dos 10 a 55% da população mundial que vive com dor crônica provavelmente desejariam o mesmo que Mário Quintana (Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor, 2015; Van Hecke *et al.*, 2013). O termo “Dor” se refere a uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano (Associação Internacional para o estudo da dor, IASP, 2011). Essencialmente, consiste em um mecanismo fisiológico importante para a proteção do organismo e prevenção de danos por sinalizar a presença de estímulos que possam ameaçar o bem-estar do indivíduo (estímulos químicos, térmicos e/ou mecânicos). Quando tais estímulos cessam e o processo de cura está completo, a dor (ou a transmissão nociceptiva) também deve cessar, ou seja, fisiologicamente a dor é passageira e dura apenas enquanto o estímulo nocivo e as respostas associadas a recuperação dos danos causados por tal estímulo estiverem presentes. Mas, como já escreveu Machado de Assis, “também a dor tem suas hipocrisias”. Dores crônicas persistem por meses ou mesmo anos, são extremamente debilitantes e estão comumente vinculadas a comorbidades como depressão, ansiedade, obesidade e insônia, além de estarem associadas a uma redução da expectativa de vida.

Dor neuropática é uma das principais modalidades de dor crônica, com uma prevalência de 7 a 18% na população mundial (Austin *et al.*, 2012). A IASP a define como uma condição decorrente de uma lesão ou disfunção do sistema somatossensorial a nível central e/ou periférico, o que resulta em respostas nociceptivas anormais. Por se tratar de uma desordem ainda pouco entendida e frequentemente resistente a tratamento, faz-se necessário identificar novos alvos terapêuticos para cura ou atenuação dos sintomas.

Dentre os principais mecanismos responsáveis pela geração da lesão ou disfunção do sistema somatossensorial, os mais comuns são compressão, isquemia, inflamação, invasão tumoral, déficits nutricionais, degeneração, entre outros (Ro *et al.*, 2005). Tais processos geram uma série de mudanças na sinalização nociceptiva (Xie *et al.*, 2005). Em condições normais, a percepção da dor envolve um equilíbrio entre vias de condução da informação nociceptiva

reguladas por vias de modulação facilitatória e vias descendentes inibitórias. O dano somatossensorial provoca um desbalanço entre esses processos excitatórios e inibitórios (Baron *et al.*, 2010; Stillman, 2006).

O professor-doutor australiano Lorimer Moseley uma vez disse durante sua conferência TED intitulada “*Why things hurt?*” que as células responsáveis pela transmissão nociceptiva se tornam cada vez melhores em transmitir dor por se tornarem cada vez mais sensíveis. De fato, alterações estruturais e moleculares em fibras relacionadas a transmissão de aferentes nociceptivos (C e A δ) podem torná-las anormalmente sensíveis a certos estímulos, gerando descargas ectópicas (Baron, 2006; Baron *et al.*, 2010; Finnerup *et al.*, 2007; Nickel *et al.*, 2011). Fibras de segunda-ordem também podem sofrer mudanças que ocasionam alterações na percepção e modulação da resposta nociceptiva (Baron, 2006; Baron *et al.*, 2010). Esses processos de sensibilização periférica e central são essenciais no desenvolvimento e manutenção do quadro de dor neuropática.

Um dos principais mecanismos moleculares de sensibilização periférica é a mudança no perfil de expressão e na permeabilidade de receptores e canais iônicos nas fibras aferentes nociceptivas e a ação de mediadores inflamatórios como citocinas, bradicinina, ácido araquidônico e prostaglandinas (Baron, 2006; Finnerup *et al.*, 2007; Nickel *et al.*, 2011).

As descargas ectópicas de fibras C e A δ podem sensibilizar os segmentos medulares para os quais transmitem a informação nociceptiva, o que constitui um mecanismo importante no processo de sensibilização central. As fibras de segunda ordem podem, ainda, sofrer alterações moleculares que modificam as propriedades da membrana, como alteração na expressão de canais iônicos e na produção e liberação de neurotransmissores e neuromoduladores (como substância P e BDNF). Ademais, os mecanismos descendentes inibitórios mediados por serotonina e noradrenalina também podem ser afetados (Stillman, 2006; Jensen *et al.*, 2001; Baron, 2006; Baron *et al.*, 2010).

Outro processo fisiopatológico evidenciado em estados de neuropatia dolorosa é a neuroplasticidade disfuncional. Dentre as estruturas envolvidas no processamento da dor que podem sofrer alterações neuroplásticas destacam-se: a substância cinzenta periaquedutal, a medula rostroventromedial, o *locus*

coeruleus, o hipotálamo, o tálamo, o cortex cingulado anterior, o cortex insular, o cortex pré-frontal, o cortex somatossensorial, o cortex motor, o *nucleus accumbens* e o hipocampo (Quintero, 2013; Chang *et al*, 2014; Mutso *et al*, 2012).

Essa variedade de mecanismos relacionados a instalação do quadro de dor neuropática e a variabilidade interindividual dificultam o tratamento dessa condição. Os clássicos analgésicos opióides não se mostram eficazes para redução de dor em quadros de neuropatia dolorosa, condição que parece ter uma resistência a essa classe de drogas.

Atualmente, a terapia de dor neuropática é baseada na utilização de inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina, ligantes de canais de Ca^{2+} , antagonistas de receptores NMDA, opióides (em doses elevadas), lidocaína, entre outros (Baron *et al.*, 2010; Gilron *et al.*, 2006; Stillman, 2006; Davis, 2007). Abordagens alternativas vem sendo empregadas, incluindo intervenções não farmacológicas como a estimulação de certas áreas corticais, terapia cognitiva e psicoterapia (Gilron *et al*, 2006). Entretanto, nenhum dos tratamentos tem mostrado grande eficácia e muitos deles acarretam sérios efeitos colaterais.

Uma das abordagens terapêuticas potencialmente efetivas é o tratamento baseado nos sintomas. Tal abordagem é dependente de um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na geração de tais sintomas de modo a determinar potenciais alvos para intervenção farmacológica (Finnerup *et al*, 2007).

O quadro de neuropatia dolorosa é marcado pelo surgimento de sintomas negativos e positivos. Os negativos envolvem perda sensorial e são manifestações desconfortáveis, mas não dolorosas. Os positivos são parestesia, disestesia, dores independentes de estímulo e dores evocadas por estímulo (Jensen *et al.*, 2001; Nickel *et al.*, 2011; Stillman, 2006). As independentes de estímulo podem se manifestar por câibra, dor espontânea em queimação, dor espontânea tipo-choque, etc (Jensen *et al.*, 2001; Gilron *et al.*, 2006). As dores evocadas por estímulo incluem hiperalgesia (resposta aumentada a um estímulo doloroso) e alodinia (dor provocada por um estímulo normalmente não doloroso) (Jensen *et al.*, 2001; Stillman, 2006; Nickel *et al.*, 2011; Gilron *et al.*, 2006).

Estímulos nocivos de natureza mecânica e térmicos de frio são comumente associados a ativação de vias nociceptivas. Em um estudo com pacientes acometidos com dores neuropáticas de diversas etiologias, o sintoma de alodinia mecânica foi observada em 49% dos casos de neuralgia pós-herpética e em 20% de todos os casos. Já a hiperalgesia térmica ao frio foi encontrada em 21% dos pacientes com neuralgia pós-herpética e 20% dos com neuropatia oriunda de lesão talâmica (Baron *et al.*, 2010).

Os mecanismos vinculados ao desenvolvimento de alterações nas respostas nociceptivas ao frio e a estímulos mecânicos não estão totalmente esclarecidos. A hiperalgesia ao frio, por exemplo, parece envolver uma reorganização cortical com alterações em fibras A δ , enquanto existem evidências de que a alodinia mecânica é mediada por fibras A β e que a hiperalgesia mecânica depende de sensibilização de receptores de fibras C (Jensen *et al.*, 2001). Em termos moleculares, algumas moléculas surgem como potenciais atuantes nos processos de transdução de sinais mecânicos e térmicos ao frio. Dentre essas moléculas, destacam-se os receptores de potencial transitório (TRPs).

Em 1969, Cosens & Manning caracterizaram uma resposta atípica de uma estirpe mutante de *Drosophila melanogaster*, que, apesar de possuir um prejuízo visual, apresentava uma fototaxia positiva no teste do labirinto em T quando expostos a uma luz ambiente baixa. Medidas de eletroretinograma demonstraram que o olho mutante, com uma primeira exposição prolongada a luz intensa, tem uma resposta inicial que retorna a linha de base após 10 a 15 segundos (sugerindo uma adaptação), enquanto em uma segunda exposição, apesar de a princípio não responsivo, o olho mutante recuperou lentamente sua responsividade após contínua exposição a uma luz de baixa intensidade. Minke e colaboradores, em 1975, interessados na melhor caracterização desse fenômeno, realizaram medições intracelulares dos fotorreceptores da retina e demonstraram que, quando expostos a luz de alta intensidade, os fotorreceptores da estirpe mutante apresentaram uma queda na eficiência de excitação em resposta a luz, ou seja, foi caracterizada nessa estirpe uma resposta transiente em resposta a estímulo luminoso. Em vista disso, os autores denominaram tal mutante como “Receptor de Potencial Transitório” (da

sigla em inglês, TRP, *Transient Receptor Potential*). Quase 20 anos depois, em 1989, Montell & Rubin caracterizaram a proteína transmembrana com 1275 aminoácidos expressa pelo locus *trp* em *Drosophila*. Hardie & Minke (1992), por sua vez, demonstraram que o influxo de cálcio induzido por luz nos fotorreceptores de *Drosophila* era dependente da proteína TRP. Finalmente, a clonagem e caracterização estrutural da proteína TRPL foi realizada em 1992 por Phillips e colaboradores. Mais tarde, o termo TRP foi adotado para a denominação de todos os membros da superfamília de canais iônicos com propriedades estruturais e funcionais semelhantes (Montell *et al.*, 2002).

Atualmente, a superfamília de canais iônicos TRPs compreende mais de 30 subtipos distintos descritos em vertebrados, divididos em 6 subfamílias, de acordo com a homologia: TRPC (Canonical), TRPV (Vaniloide), TRPM (Melastatina), TRPA (Anquirina), TRPP (Policistina) e TRPML (MucoLipina) (Julius, 2013; Benemei *et al.*, 2015). As similaridades dentre membros da mesma subfamília pode chegar a mais de 90%, mas entre diferentes subfamílias não há um grau de similaridade tão proeminente (Flockerzi, 2007).

As características mais determinantes para a inclusão de uma proteína na família de receptores TRPs é apresentar pelo menos 6 domínios transmembrana com porções C e N-terminais citoplasmáticas e ser permeável a cátions como sódio, cálcio e magnésio com baixa seletividade (com exceção de TRPM4 e TRPM5, que são seletivos para cátions monovalentes, e TRPV5 e TRPV6, altamente seletivos para cálcio) (Patapoutian *et al.*, 2009; Smani *et al.*, 2015). Estímulos de diversas naturezas podem desencadear a ativação de tais receptores, incluindo químicos, térmicos, mecânicos, luminosos, elétricos (alteração de voltagem), osmolaridade, lipídios, estresse oxidativo, variações de pH e feromônios. A regulação da expressão ou função desses receptores também varia, compreendendo mecanismos de regulação transcricional, *splicing* alternativo, glicosilação e fosforilação, entre outros (Levine & Alessandri-Haber, 2007).

Os receptores TRP são expressos em diferentes tecidos do organismo, incluindo fibras sensoriais, pulmões, células epiteliais, sistema cardiovascular, rins e regiões do sistema límbico. Dependendo da classe e do tecido em que estão expressos, esses canais podem exercer diversos papéis fisiológicos. A

homeostase de cálcio, crescimento axonal, osmorregulação, desenvolvimento de queratinócitos e transdução sensorial são alguns dos processos nos quais os TRPs parecem participar (Julius, 2013). Os receptores TRPC, por exemplo, contribuem para a despolarização da musculatura lisa e vasoconstricção, para o controle da filtração glomerular, para o direcionamento do crescimento do cone neuronal mediado por BDNF (sigla derivada do inglês, *Brain-Derived Neurotropic Factor*) e podem participar na liberação de insulina pelas células β -pancreáticas (Li *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2015; Smani *et al.*, 2015). Já o receptor TRPM7 participa na homeostase do Mg^{2+} , na proliferação celular e na regulação da migração de células endoteliais (Zeng *et al.*, 2014; Cuffe *et al.*, 2015; Bessac & Fleig, 2007).

Canalopatias que afligem os receptores TRPs participam em processos fisiopatológicos diversos. Por exemplo, mutações no receptor TRPM4 estão implicadas em arritmias cardíacas, enquanto polimorfismos do gene que codifica a proteína TRPM5 parecem estar envolvidos com a manifestação de um estado pré-diabético. Outros receptores podem contribuir para a tumorigênese, como TRPV2, que tem um papel importante nos processos de proliferação e invasão tumoral em tumores de próstata (Smani *et al.*, 2015).

Com relação ao papel sensorial dos receptores TRPs, esses canais tem uma relevância fisiológica em processos de quimiosensação, termosensação e mecanosensação (Wang & Woolf, 2005), com participação na transmissão de estímulos nociceptivos. O primeiro receptor TRP a ser descoberto em fibras sensoriais de mamíferos foi TRPV1 (Stucky *et al.*, 2009). Depois disso, alguns outros receptores da mesma família foram detectados em fibras sensoriais do gânglio da raiz dorsal: TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM8 e TRPA1 (Levine & Alessandri-Haber, 2007). Além de possuírem uma relevância fisiológica na transmissão nociceptiva normal, evidências mostram a participação desses canais em processos fisiopatológicos relacionados a instalação do quadro de dores crônicas, tanto as de origem inflamatória quanto as associadas a neuropatias.

TRPV1 é o canal TRP mais bem caracterizado quanto a participação na transmissão nociceptiva. Altamente expresso em nociceptores, é ativado por químicos como capsaicina e endocanabinóides, por baixo pH e por

temperaturas acima de 43°C. Mediadores como bradicinina, prostaglandina E2, ATP extracelular, glutamato e fator de crescimento neuronal causam sua sensibilização (Levine & Alessandri-Haber, 2007; Cortright *et al.*, 2007). O principal papel do receptor TRPV1 é a integração de estímulos nocivos de diferentes modalidades (térmicos, químicos e acidificação) e de mediadores inflamatórios, uma resposta importante no processo de nocicepção, tornando tal receptor um alvo interessante para intervenção farmacológica.

Na fisiopatologia de dores crônicas e especificamente de dor neuropática, TRPV1 participa tanto nos processos de sensibilização periférica quanto central. A injúria do sistema somatosensorial causa uma redução da expressão do canal em fibras lesionadas e aumento de expressão nas fibras vizinhas a lesão. Além disso, a instalação de um quadro inflamatório do local da lesão causa uma sensibilização do receptor através da liberação de moduladores como bradicinina. A nível central, TRPV1 modula a transmissão sináptica na medula espinal, levando a liberação de neuropeptídeos pró-nociceptivos, como substância P, e a ativação de vias nociceptivas glutamatérgicas (Patapoutian *et al.*, 2009).

Além de TRPV1, os receptores TRPV4, TRPA1 e TRPM8 demonstraram relevância em processos fisiológicos e fisiopatológicos associados a transmissão nociceptiva. TRPV4 atua em processos de mecano e termotransdução e é sensibilizado por mediadores como prostaglandinas E2 e serotonina, com estudos corroborando sua participação na instalação do quadro de hiperalgesia mecânica em dor inflamatória e em modelos de dor neuropática (Levine & Alessandri-Hader, 2007). Já os receptores TRPM8 e TRPA1, de particular interesse para o presente estudo, serão discutidos em maiores detalhes a seguir.

Em 1999, Jaquemar e colaboradores detectaram em fibroblastos um gene localizado no cromossomo humano 8 que codifica uma proteína de 1119 aminoácidos que apresenta repetições do motivo de anquirina na porção N-terminal. Então denominada ANKTM1, tal proteína foi posteriormente caracterizada como um membro da família de receptores TRP e referida como TRPA1. Esse receptor é ativado por uma série de substâncias, exógenas ou endógenas, incluindo componentes que elicitam respostas do tipo-nociceptivas,

como óleo de mostarda, alil-isotiocianato, cinamaldeído, icilina, fumaça de cigarro, formalina, prostaglandinas, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, óxido nítrico, CO₂, ácido láctico, metilglioxal e 4-hidroxinonenal, entre outros (Baraldi *et al.*, 2010; Eberhardt *et al.*, 2012; Koivisto & Pertovaara, 2013; Andersson *et al.*, 2013). TRPA1 apresenta 20% de homologia com TRPV1 na sequência de aminoácidos e é expresso em fibras sensoriais de pequeno calibre, com altos níveis de co-expressão com TRPV1 (Stucky *et al.*, 2009; Tominaga & Caterina, 2004).

Quanto a funções sensoriais, apesar da caracterização inicial como um potencial receptor de frio, quando Story e colaboradores, em 2003, propuseram que TRPA1 atuaria como um sensor de temperaturas frias nocivas, abaixo de 17°C (Dhaka *et al.*, 2007), o papel desse receptor na sensação térmica de frio não é uma unanimidade na literatura (Bodkin & Brain, 2011; Caspani & Happenstall, 2009; Fernandes *et al.*, 2012; Stucky *et al.*, 2009). Por exemplo, Chen *et al.* (2013) evidenciaram em um estudo *in vitro* avaliando a sensibilidade do receptor TRPA1 humano que tal receptor não só não é ativado por frio como também parece ter sua atividade reduzida quando exposto a temperaturas mais refrescantes. Apesar desse papel controverso como um sensor de frio nocivo, a participação de TRPA1 na transmissão nociceptiva se mostra relevante, uma vez que tal canal se destaca como um receptor polimodal que pode atuar como um integrador de estímulos nocivos de diferentes naturezas, a exemplo de TRPV1.

Mecanosensação é uma das potenciais propriedades de receptores TRPA1. A similaridade com canais mecanosensores de *Drosophila* (TRPN e *painless*), as propriedades biofísicas semelhantes a canais mecanossensíveis quanto a abertura de poros, a expressão de TRPA1 em nociceptores responsivos a estímulos mecânicos e a potencial participação desse receptor na resposta das células ciliadas do sistema auditivo a estímulo mecânico são algumas das evidências que suportam a possível função de TRPA1 como um termotransdutor (García-Añoveros & Nagata, 2007; Stucky *et al.*, 2009; Levine & Alessandri-Haber, 2007). Além disso, Kindt *et al.* (2007) demonstraram em *Caenorhabditis elegans* que uma mutação no gene *trpa1* altera as respostas comportamentais frente a um estímulo mecânico. Ainda evidenciando o papel

de TRPA1 como mecanosensor, Kwan e colaboradores (2006) indicaram que camundongos *knockout* para esse receptor apresentaram uma resposta reduzida a estímulos mecânicos nocivos comparados aos camundongos do tipo-selvagem. Bautista e colaboradores (2006), entretanto, não encontraram resultados equivalentes. Além disso, estudos com intervenção farmacológica demonstraram uma redução do limiar mecânico de animais tratados com antagonistas TRPA1 em modelos de dor inflamatória e que a aplicação do agonista óleo de mostarda aumenta a sensibilidade mecânica (Petrus *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2010). Existem, ainda, evidências de que TRPA1 medeia as alterações de respostas a estímulo mecânico induzidas por dinorfina A e prostaglandina E₂ (Wei *et al.*, 2013A; Dall'Acqua *et al.*, 2014). Dessa forma, TRPA1 surge como um potencial candidato a agir como um mecanosensor, e, consequentemente, pode ter implicância para as alterações de sensibilidade mecânica observada em quadros de dor neuropática, principalmente porque evidências mostram que, em processos patológicos, TRPA1 pode atuar tanto na sensibilização periférica, uma vez que é sensibilizado por mediadores pró-nociceptivos, como prostaglandina E₂ e bradicinina, quanto na sensibilização central, já que TRPA1 pode facilitar a ativação de sinapses glutamatérgicas responsáveis pela transmissão de sinais nociceptivos na medula espinal (Koivisto *et al.*, 2014; Koivisto & Pertovaara, 2013; Kosugi *et al.*, 2007).

Inicialmente descrito em células prostáticas (Tsavaler *et al.*, 2001), o receptor TRPM8 foi posteriormente caracterizado em fibras sensoriais como um receptor sensível a frio e a mentol (Peier *et al.*, 2002; McKemy *et al.*, 2002). Consiste em uma proteína de 128kDa e 1104 aminoácidos ativada por fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂). Estudos com animais *knockout* para TRPM8 demonstraram o papel desse receptor na detecção de temperaturas frias abaixo de de 26±2°C, compreendendo tanto frio inócuo quanto nocivo (Knowlton & McKemy, 2010). O fluxo de íons através de TRPM8 aumenta com o decréscimo da temperatura, atingindo a corrente máxima a aproximadamente 10°C. Além de mentol, substâncias químicas como icilina, WS-12 e CPS-369 também ativam TRPM8 (Yudin & Rohacs, 2012; Xing *et al.*, 2007; Stucky *et al.*, 2009). É expresso por aproximadamente 20% dos neurônios do gânglios da

raiz dorsal (GRD) em neurônios sensoriais de pequeno e médio diâmetro (Peier *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2005; Binder *et al.*, 2011).

A caracterização de TRPM8 como um receptor de frio e sua detecção em fibras nociceptivas despertou o interesse na investigação desse canal como um potencial mediador de mecanismos fisiopatológicos associados a manifestação de hipersensibilidade a estímulo frio. Entretanto, os resultados encontrados são diversos, com alguns autores propondo um papel crucial desse receptor em respostas hiperalgésicas e alodínicas ao frio, enquanto outros questionam a importância desse receptor na fisiopatologia de dor neuropática (Caspani *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2011, Xing *et al.*, 2007). Nesse contexto, a ativação de TRPM8 parece ter um papel dual em modelos de dor neuropática, podendo ocasionar tanto a indução quanto a supressão de respostas nociceptivas. Apesar de ter sua ativação constantemente associada a estimulação de vias nociceptivas, alguns estudos, como o de Proudfoot *et al.* (2006), mostraram que a indução de TRPM8 pode ter um efeito analgésico tanto em modelos de dor inflamatória quanto de dor neuropática, e alguns autores defendem que altas concentrações de mentol (agonista TRPM8) podem originar hiperalgesia ao frio em sujeitos normais e ao mesmo tempo ter efeito analgésico em pacientes com dor neuropática (Patel *et al.*, 2014). Nesse contexto, a melhor caracterização do potencial papel de TRPM8 no processo fisiopatológico de instalação do quadro hipersensibilidade ao frio em dor neuropática se mostra necessária, de modo a determinar se tal receptor é um potencial alvo de intervenção farmacológica.

Em suma, a abordagem terapêutica baseada nos sintomas é uma das formas de terapia potencialmente mais efetivas em dor neuropática, tornando crucial a investigação dos mecanismos relacionados a manifestação de tais sintomas. Alodinia mecânica e hipersensibilidade ao frio são alguns dos mais comumente relatados sintomas em casos de neuropatia dolorosa, mas os mecanismos relacionados a instalação desses sinais não estão completamente elucidados. Os receptores TRPs são moléculas importantes no processo de nocicepção, com especial destaque para TRPA1 e TRPM8, canais cuja relevância para a transmissão nociceptiva, especialmente de estímulos mecânicos e frios, tem sido recentemente evidenciada. Por isso, tais canais se

destacam como potenciais atuantes na fisiopatologia de alodinia mecânica e de hipersensibilidade a estímulos frios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar as alterações na percepção a estímulos mecânicos e ao frio em um modelo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático em ratos, bem como avaliar a participação dos receptores TRPA1 e TRPM8 nas respostas nociceptivas observadas.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar o decurso temporal das alterações na percepção a estímulo mecânico e ao frio em modelo de dor neuropática induzida através da constrição do nervo ciático (CCI) em ratos, caracterizando fenômenos como hipoalgesia, hiperalgesia ou alodinia;
- Avaliar a resposta nociceptiva direta frente à administração intraplantar de agonistas de receptores TRPA1 ou TRPM8;
- Determinar o efeito da estimulação dos receptores TRPA1 e TRPM8 sobre o limiar de resposta a estímulo mecânico e a latência de resposta ao frio, respectivamente;
- Verificar o efeito da inibição dos receptores TRPA1 e TRPM8 sobre o limiar de resposta a estímulo mecânico e a latência de resposta ao frio, respectivamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos machos da variedade Wistar, provenientes do biotério Central da Universidade Federal do Paraná (UFPR), todos com peso entre 180 e 220 gramas no início dos experimentos. Por pelo menos 2 dias antes de serem submetidos as abordagens experimentais e durante todo o período de experimentos os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia, com livre acesso a ração e água e sob condições controladas de temperatura e ciclo claro/escuro. Todos os experimentos foram conduzidos conforme as normas e legislações estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO-UFPR #685).

3.2. Drogas

No presente estudo foram utilizados os anestésicos cetamina (Vetecia Laboratórios de Produtos Veterinários) e xilazina (Rhobifarma Indústrias Farmacêuticas). Os agonistas óleo de mostarda e mentol (Santa Cruz Biotechnology Inc.) foram aplicados via intraplantar nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1% e no volume de 50µl (veículo: óleo de milho). Os antagonistas HC030031 (Sigma) e AMTB foram administrados via intraplantar no volume de 40µl (veículo: óleo de milho) e na dose de 300µg/pata.

3.3. Cirurgia para indução de dor neuropática

A neuropatia periférica foi induzida através da ligação do nervo ciático esquerdo, de acordo com método previamente descrito por Bennett & Xie (1988) sob anestesia induzida por cetamina (60 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg). Foram feitas quatro ligaduras com fio de seda 4.0 não absorvível ao redor do nervo ciático na altura da coxa, com aproximadamente 1 mm de distância entre cada ligadura. No grupo controle falso-operado (Sham), o nervo foi apenas

exposto. Logo depois de concluída a realização da ligadura ou a simples exposição do nervo, o tecido epitelial foi suturado com fio de seda 2.0.

Os ratos foram monitorados após a cirurgia e os animais nos quais foi observado o comportamento de contínua guarda da pata ipsilateral ao procedimento foram excluídos do grupo experimental, uma vez que esse comportamento poderia indicar que durante a cirurgia fibras motoras foram lesadas ou que as fibras sofreram uma lesão de axotomia, o que prejudicaria a avaliação comportamental dos animais e a homogeneidade do grupo com neuropatia.

3.4. Testes comportamentais

3.3.1 Avaliação da sensibilidade térmica ao frio

Para avaliar as alterações da percepção ao frio provocadas pela neuropatia induzida pela constrição do nervo ciático foram utilizados: 1) o teste de instilação plantar de acetona e 2) o teste da placa fria. No primeiro procedimento, os ratos foram colocados em caixas de acrílico com assoalho de 5 mm² correspondente a uma rede de malha feita de arame não maleável de 1 mm. O tempo de ambientação foi entre 15 e 20 minutos ou até que cessassem os comportamentos exploratórios. Após a adaptação ao ambiente, um jato de 100 µL de acetona foi instilado na pata traseira esquerda do animal com uma seringa de insulina a uma distância de aproximadamente 5 mm da pata, por entre a malha da caixa de observação. Quantificou-se durante 2 minutos o número de *flinches* (sacudidas) em resposta ao resfriamento da pele induzido pela acetona. Os parâmetros avaliados foram considerados como os índices de resposta a estímulo frio e o aumento ou redução dos valores encontrados foram interpretados como alodinia ou hipoalgesia ao frio, respectivamente.

O outro teste consistiu na avaliação da latência de resposta de retirada da pata do animal ao ser colocado em uma placa fria (Ugo Basile, Comerio, Itália) com temperatura de $4,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. O tempo de reação foi avaliado antes e em diferentes momentos após o procedimento de constrição do nervo ciático.

Além disso, para determinar se haveria diferença na temperatura limiar para desencadear um estímulo nociceptivo entre os grupos CCI e sham e para

avaliar as diferenças nas respostas a diferentes temperaturas, os ratos foram submetidos a um teste de Placa Fria modificado, com a mensuração da latência de resposta a diferentes temperaturas em escala crescente, com início em 4°C e acréscimo de 5 em 5°C até atingir 24°C, ou seja, foi mensurada a latência de resposta dos animais no teste da Placa fria nas temperaturas de 4°C, 9°C, 14°C, 19°C e 24°C, com intervalo de pelo menos 1 hora entre cada temperatura. Foi utilizado um tempo de corte de 3 minutos.

3.3.2 Avaliação da sensibilidade mecânica

A alodinia mecânica foi avaliada através do teste de pressão crescente na pata dos ratos (Von Frey eletrônico), aplicado por um anesthesiômetro eletrônico (*IITC Life Science*, Califórnia, EUA). O aparelho possui um transdutor de força conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). Uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao transdutor realiza o contato entre o transdutor de força e a pata. Os animais foram colocados nas mesmas caixas de acrílico utilizadas no teste de acetona durante 15 a 20 minutos ou até que cessassem os comportamentos exploratórios. Após a ambientação, foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma força crescente no centro da região plantar da pata ipsilateral a cirurgia. O estímulo era cessado quando o animal produzia uma resposta de retirada e sacudida da pata estimulada. A intensidade da alodinia mecânica foi, então, quantificada e expressa como a média de três valores obtidos em diferentes tempos após o procedimento de indução da neuropatia.

3.3.3 Administração dos agonistas TRPA1 e TRPM8

Foi realizada a injeção intraplantar de 50µl de de diferentes concentrações (0.1%, 0.5% e 1%) de agonistas de receptores TRPA1 (óleo de mostarda) e TRPM8 (mentol) na segunda semana após a realização da cirurgia. Antes da aplicação, os animais foram alocados individualmente por 20 minutos para ambientação em um cilindro transparente. Após a injeção, foi quantificado o tempo despendido sacudindo ou elevando a pata estimulada de 5 em 5 minutos durante um período total de 20 minutos. Paralelamente, foi

avaliado o efeito da administração local desses agonistas sobre o limiar de retirada frente a estímulos frios ou frente a estímulo mecânico, dependendo se o animal recebeu agonista TRPM8 ou agonista TRPA1, respectivamente.

3.3.4 Administração dos antagonistas TRPA1 e TRPM8

Ainda para investigar o papel dos receptores da família TRP na fisiopatologia de dor neuropática, os inibidores de cada receptor, AMTB (antagonista TRPM8) e HC030031 (antagonista TRPA1), foram aplicados em uma injeção única via intraplantar (40µl, 300µg/pata) e foi mensurado o efeito nas respostas ao frio (através do teste da placa fria, a temperatura de $4,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) e a estímulo mecânico (através do teste de Von Frey eletrônico), respectivamente.

3.5. Análise estatística

Os dados estão representados como média \pm EPM de 5 a 10 animais por grupo experimental. Os dados foram analisados por meio de ANOVA de uma via seguido do teste de Newman-Keuls para comparação entre os grupos experimentais ou ANOVA de duas vias (tratamento e tempo) seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Foram realizados testes de correlação dos dados de limiar de retirada da pata frente a estímulos mecânicos, químicos e térmicos de frio. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Experimento 1: determinação das alterações da percepção ao frio e do estabelecimento da alodinia mecânica no decorrer de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo ciático

Após a mensuração das respostas basais a frio (testes de acetona e placa fria) e a estímulo mecânico (Von Frey eletrônico), foi realizada a cirurgia para separação dos animais em dois grupos experimentais: 1) CCI, nos quais houve constrição do nervo ciático, 2) sham (falso-operados, nervo foi exposto,

mas não passou pelo procedimento de ligadura). Os grupos experimentais foram, então, submetidos aos testes comportamentais em diferentes tempos pós-cirurgia para avaliação do limiar de retirada da pata frente a estímulo térmico de frio através da placa fria e do teste de acetona e avaliação do limiar de sensibilidade mecânica, através do teste de Von Frey eletrônico. No primeiro protocolo adotado, os animais foram avaliados no teste de Von Frey eletrônico e no teste da acetona em medidas basais pré-cirurgia e em diferentes semanas após a indução da neuropatia (1^a, 2^a, 3^a e 4^a semanas). Tendo em vista uma melhor caracterização do decurso temporal da manifestação de alodinia mecânica e hiperalgesia ao frio, um segundo protocolo foi adotado posteriormente, avaliando a sensibilidade mecânica (através do Von Frey eletrônico) e a sensibilidade ao frio (através da placa fria mantendo a temperatura em 4°C) em medidas basais e no 4^a, 7^a, 10^a e 14^a dias pós-cirurgia. O teste de placa fria com escala de frio foi posteriormente realizado, no 10^o dia pós-cirurgia, para determinar diferenças de responsividade dos animais frente a diferentes temperaturas e para caracterizar se a neuropatia acarretaria em uma mudança na percepção dos animais com relação a discriminação de temperaturas frias como nocivas ou inócuas.

4.2 Experimento 2: Investigação do envolvimento dos receptores TRPA1 e TRPM8 nas alterações na percepção de estímulos frios na dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo ciático

No 15^o dia após a constrição crônica do nervo, os animais receberam administração intraplantar de mentol (agonista TRPM8) ou óleo de mostarda (agonista TRPA1) e, em seguida, foram avaliadas as respostas nociceptivas (sacudidas ou elevação da pata estimulada) de 5 em 5 minutos, durante um período total de 20 minutos. Determinou-se, ainda, se tais agonistas afetaram as respostas a estímulo frio (no caso de TRPM8) e a estímulo mecânico (no caso de TRPA1). Para fazer isso, logo após a quantificação da resposta nociceptiva direta em número de flinches os animais foram submetidos aos testes de placa-fria (a temperatura de 4,0±0,1°C) e Von Frey eletrônico,

respectivamente. Foram utilizados como controle grupos sham (tratados com veículo ou agonistas) e CCI (tratados com veículo), que tiveram suas respostas comparadas com as mensuradas no grupo teste (CCI tratado com agonista).

Além disso, em experimentos independentes, no 10º ou 7º dias após a constrição crônica do nervo, foi realizada a administração intraplantar de AMTB (antagonista TRPM8) ou HC030031 (antagonista TRPA1). Os animais foram, então, submetidos ao teste de placa fria ou Von Frey Eletrônico, respectivamente, de modo a verificar o efeito do bloqueio de TRPM8 na resposta a estímulo frio e do bloqueio de TRPA1 na resposta a estímulo mecânico dos animais com neuropatia. Após a administração do antagonista, as medidas nos testes comportamentais foram feitas de hora em hora por até 4 horas. Foi utilizado como controle um grupo CCI tratado com veículo, que teve suas respostas comparadas com as mensuradas no grupo teste (CCI tratado com antagonista).

5 RESULTADOS

5.1 Alterações nociceptivas decorrentes da injúria por constrição crônica do nervo ciático

Animais CCI e Sham partindo de valores basais equivalentes no teste de Von Frey eletrônico foram avaliados semanalmente quanto à resposta a estímulo mecânico. Os ratos do grupo CCI manifestaram um reduzido limiar mecânico a partir da primeira semana pós-cirurgia, com persistência até a quarta semana, enquanto no grupo Sham não foi observada nenhuma alteração significativa da resposta a estímulo mecânico (Figura 1A; 1ª semana: CCI= $33,8 \pm 2,3$, Sham= $44,0 \pm 1,7$; 2ª semana: CCI= $31,2 \pm 1,5$, Sham= $46,1 \pm 2,9$; 3ª semana: CCI= $29,3 \pm 1,9$, Sham= $45,6 \pm 2,5$; 4ª semana: CCI= $31,9 \pm 2,6$, Sham= $48,0 \pm 1,9$) ($p \leq 0,05$). Visando o bem-estar dos animais e a melhor caracterização da progressão temporal do desenvolvimento de alodinia mecânica, animais partindo de limiares basais pré-cirurgia equivalentes foram testados no Von Frey eletrônico em intervalos de dias após a cirurgia (4º, 7º, 10º e 14º dias). Nessa abordagem, verificou-se uma redução do limiar mecânico do grupo CCI já no 4º dia pós-cirurgia, mantendo-se reduzido até o

14º dia, enquanto nos animais Sham não houve uma alteração significativa do limiar mecânico (Figura 1B; 4º dia: CCI= 20,9±1,0, Sham= 42,1±1,2; 7º dia: CCI= 19,5±1,2, Sham= 42,8±0,7; 10º dia: CCI= 19,6±0,9, Sham= 40,4±1,3; 14º dia: CCI= 17,5±0,9, Sham= 43,5±0,9) ($p \leq 0,05$).

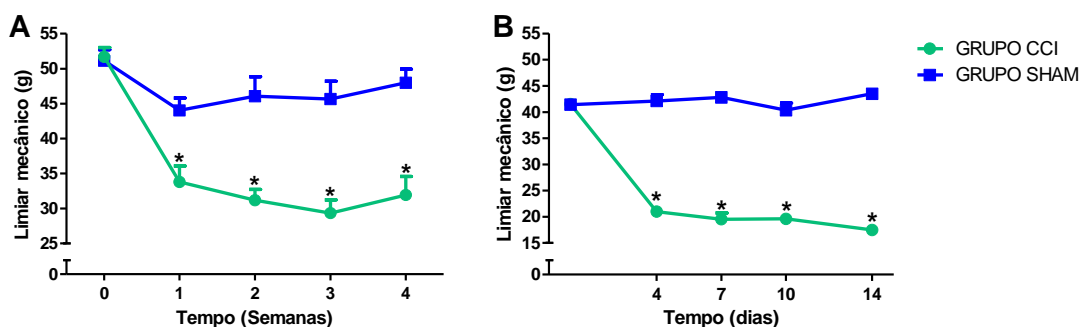


Figura 1. Decurso temporal das alterações nas respostas nociceptivas a estímulo mecânico. Avaliação do limiar mecânico através do teste de Von Frey eletrônico semanalmente (A) ou em diferentes dias (B) após o procedimento de indução da dor neuropática. Valores representam Média \pm EPM e (*) indica $p \leq 0,05$ quando comparado com a medida equivalente no grupo controle Sham.

A sensibilidade ao frio foi inicialmente avaliada através do teste de acetona. A contagem de *flinches* por 2 minutos pós-instilação na pata ipsilateral a cirurgia evidenciou que os ratos com neuropatia, que antes da cirurgia manifestaram uma resposta semelhante a dos animais Sham (CCI= 4,1±0,4, Sham= 3,8±0,9), apresentaram um maior número de *flinches* em resposta ao estímulo refrescante, comparado ao grupo controle. Esse aumento foi detectado na primeira semana pós-cirurgia, com pico na segunda semana e manutenção até pelo menos a quarta semana (Figura 2A; 1ª semana: CCI= 10,0±1,8, Sham= 4,7±0,6; 2ª semana: CCI= 15,6±1,7, Sham= 6,7±2,1; 3ª semana: CCI= 16,0±1,9, Sham= 4,3±0,9; 4ª semana: CCI= 13,2±1,5, Sham= 4,3±1,1) ($p \leq 0,05$).

A instilação de acetona é reconhecida como um estímulo refrescante, mas não há como determinar o exato nível de refrescância, ou seja, a qual temperatura, exatamente, a pata dos animais foi exposta. Com isso, optou-se pela realização do teste da Placa-fria, que permite a avaliação da resposta frente a exposição a uma temperatura pré-determinada. Baseado em estudos anteriores (Su *et al.*, 2011), tal temperatura foi definida como 4,0±0,1°C. A

exposição pré-cirurgia a essa temperatura induziu respostas médias de $19,4 \pm 3,1$ segundos nos ratos CCI e de $18,8 \pm 2,3$ segundos nos ratos Sham, as quais não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa. Verificou-se uma redução da latência de resposta dos animais CCI quando comparados ao grupo Sham logo no 4º dia pós-cirurgia. Essa resposta hiperalgésica esteve presente por pelo menos 14 dias, com pico no 10º dia de avaliação (Figura 2B; 4º dia: CCI= $8,9 \pm 2,4$, Sham= $18,4 \pm 3,0$; 7º dia: CCI= $5,9 \pm 1,9$, Sham= $16,0 \pm 1,6$; 10º dia: CCI= $4,6 \pm 1,8$, Sham= $17,7 \pm 1,8$; 14º dia: CCI= $7,9 \pm 2,3$, Sham= $19,1 \pm 0,8$) ($p \leq 0,05$).

A hipersensibilidade dos animais CCI quando expostos a um estímulo refrescante e a uma temperatura reconhecida como nociva ($4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) demonstrou que a neuropatia provocou alterações no sistema de termotransdução de frio. Mas qual seria a implicância dessa lesão para o reconhecimento de uma temperatura como um estímulo frio nocivo ou como um estímulo frio inócuo? Para testar se o limiar de reconhecimento de uma temperatura fria como nociva estaria afetado, os grupos foram submetidos a um teste de Placa-fria modificado, em que foram sucessivamente avaliados, em intervalos apropriados, quanto a latência de resposta a diferentes temperaturas em uma escala crescente, com aumento de 5 em 5°C . Observou-se que os animais CCI tiveram uma menor latência de resposta em comparação ao grupo Sham em todas as temperaturas entre $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ e $19,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ ($4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$: CCI= $3,1 \pm 0,9$, Sham= $14,7 \pm 3,5$; $9,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$: CCI= $2,7 \pm 0,2$, Sham= $29,2 \pm 11,9$; $14,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$: CCI= $6,3 \pm 2,7$, Sham= $38,1 \pm 10,4$; $19,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$: CCI= $19,6 \pm 6,8$, Sham= $138,8 \pm 14,2$) ($p \leq 0,05$). Ademais, enquanto os animais Sham se mostraram virtualmente insensíveis a temperatura de $19,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, ou seja, não reconheceram mais tal temperatura como nociva, os animais CCI ainda tiveram uma resposta do tipo-nociceptiva quando expostos a essa temperatura, indicando a manifestação de uma alodinia ao frio (Figura 2C). Todos os animais foram testados também a temperatura de $24,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$, mas apenas um dos animais do grupo CCI, ao ser exposto a tal temperatura, manifestou uma latência de resposta abaixo dos 180 segundos pré-determinados como tempo de corte (latência de 67,5 segundos).

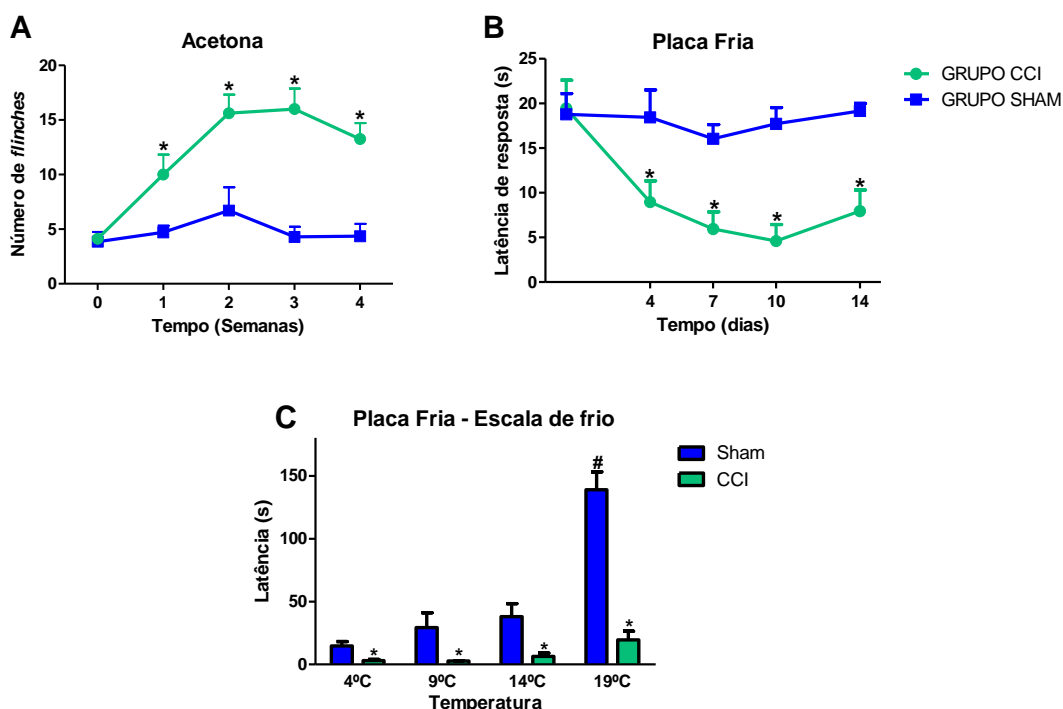


Figura 2. Respostas nociceptivas a estímulo frio. (A) Avaliação semanal da resposta nociceptiva direta (em número de flinches) dos grupos CCI e Sham frente a aplicação do estímulo frio (instilação de acetona); (B) Latência de resposta ao frio dos grupos CCI e Sham em diferentes dias após a cirurgia, avaliada através do teste da Placa Fria, com temperatura mantida em $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; (C) Teste da Placa Fria com escala de frio (4°C - 24°C), realizado no 10º dia pós-cirurgia com avaliação da latência de resposta a estímulo frio frente a diferentes temperaturas (aumentadas gradativamente de 5 em 5°C). Valores representam Média \pm EPM, (*) indica $p \leq 0,05$ quando comparado com a medida equivalente no grupo controle Sham e (#) indica $p \leq 0,05$ quando comparado com a latência de resposta encontrada para outras temperaturas dentro do mesmo grupo.

5.2 Sensibilidade do receptor TRPA1

Como indicado no desenho experimental (Figura 3A), o agonista TRPA1, óleo de mostarda (MO), foi aplicado via intraplantar para verificar se a ativação desse receptor desencadearia uma resposta nociceptiva direta (em número de *flinches*) e se tal resposta estaria afetada no modelo de dor neuropática. Verificou-se que, durante os 20 minutos de quantificação, ambos os grupos, CCI e Sham, manifestaram uma resposta significativamente exacerbada frente a todas as concentrações de MO (0,1%: CCI= $124,8 \pm 13,2$, Sham= $78,9 \pm 11,4$; 0,5%: CCI= $190,7 \pm 26,6$, Sham= $132,4 \pm 13,9$; 1%: CCI= $242,4 \pm 18,6$, Sham= $112,0 \pm 20,9$) quando comparada aos respectivos grupos veículos (Veículo: CCI= $20,3 \pm 4,6$, Sham= $22,5 \pm 3,1$) ($p \leq 0,05$), indicando que o agonista ativou vias nociceptivas. Entretanto, MO em todas as concentrações causou uma resposta

ainda mais proeminente no grupo CCI e que foi estatisticamente maior comparado ao grupo Sham que recebeu o mesmo tratamento (Figura 3B).

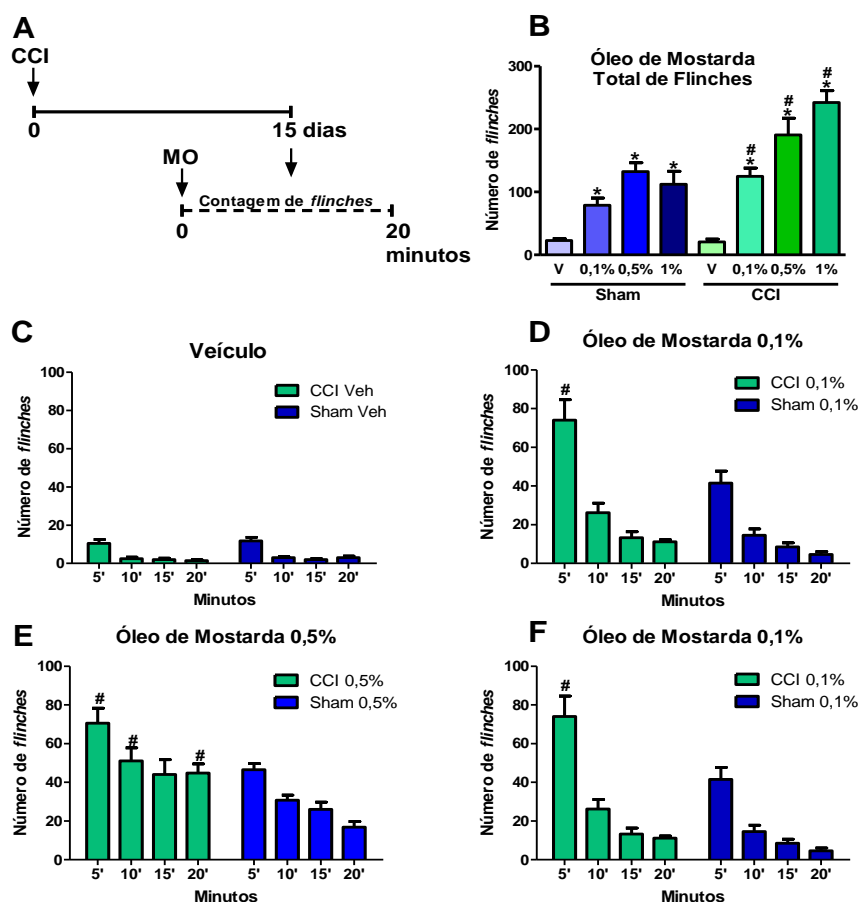


Figura 3. Resposta nociceptiva direta frente a aplicação intraplantar do agonista TRPA1, óleo de mostarda (MO). (A) Desenho experimental: 15 dias após a realização da cirurgia os animais receberam, via intraplantar, 50µl do agonista TRPA1, óleo de mostarda (MO, 0.1%, 0.5% e 1%) ou de veículo e o número de *flinches* foi quantificado durante 20 minutos; (B) Resposta nociceptiva direta (em número de *flinches*) frente a estimulação de TRPA1 por seu agonista, MO, nas concentrações de 0,1%, 0,5% e 1%. (C) Resposta frente a administração de veículo, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos; (D) Resposta nociceptiva direta frente a aplicação de óleo de mostarda 0,1%, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos; (E) Resposta nociceptiva direta frente a aplicação de óleo de mostarda 0,5%, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos; (F) Resposta nociceptiva direta frente a aplicação de óleo de mostarda 1%, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos. Valores representam Média ± EPM, (*) indica $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo veículo correspondente e (#) indica $p \leq 0,05$ quando comparado ao grupo Sham correspondente ao mesmo tratamento/time point.

5.3 TRPA1 e sensibilidade mecânica

No 15º dia pós-cirúrgico, o teste de Von Frey eletrônico foi realizado logo após a quantificação da resposta nociceptiva direta frente a administração intraplantar de MO, de modo a caracterizar o efeito da ativação de TRPA1

sobre o limiar de resposta mecânica dos animais. A análise estatística indicou que MO, nas concentrações de 0,5% e 1%, reduziu de modo significativo o limiar mecânico tanto dos animais Sham quanto dos animais CCI em comparação aos limiares basais e aos limiares encontrados no 14º dia pós-cirurgia (Figura 4A e B).

Além disso, foi investigado o efeito da inibição de TRPA1. O bloqueador HC030031 (40µl, 300µg/pata, via i.pl.) se mostrou eficaz na redução da resposta nociceptiva direta de animais naïve frente a administração do agonista óleo de mostarda (1%), indicando que a droga foi capaz de inibir as respostas mediadas por TRPA1 (Figura 4C). Dessa forma, o efeito do tratamento com HC030031 sobre a sensibilidade mecânica dos animais CCI foi avaliado através do teste de Von Frey eletrônico. Uma vez que a redução do limiar mecânico foi proeminente no 7º dia pós-cirurgia, sem diferença estatisticamente significativa para os limiares encontrados no 10º e 14º dias, esse dia foi determinado como o *time point* para avaliação do efeito da administração de HC030031 (300µg/pata; em 40 µL). Foram realizadas medidas pré-tratamento e medidas em diferentes horas após o tratamento. A administração de veículo não alterou significativamente o limiar mecânico dos animais CCI. Por outro lado, observou-se que animais tratados com HC030031 apresentaram um aumento significativo do limiar de resposta a estímulo mecânico na primeira hora após o tratamento, retornando aos valores pré-tratamento já na segunda hora (Figura 4D).

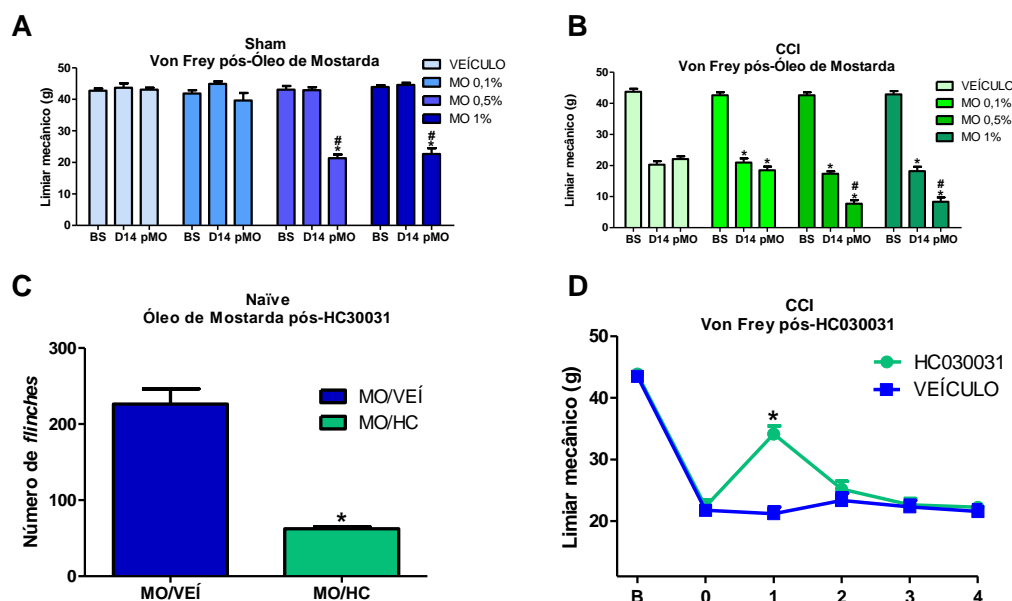


Figura 4. Manipulação farmacológica da atividade de TRPA1 e efeito sobre o limiar de resposta a estímulo mecânico. (A) Limiar mecânico dos animais do grupo Sham avaliado através do teste de Von Frey eletrônico, com valores basais (BS), do 14º dia pós-cirurgia (D14) e frente a administração de diferentes concentrações do agonista TRPA1, óleo de mostarda (pMO; 0.1%, 0.5% e 1%); (B) Limiar mecânico dos animais do grupo CCI avaliado através do teste de Von Frey eletrônico, com valores basais (BS), do 14º dia pós-cirurgia (D14) e frente a administração de diferentes concentrações do agonista TRPA1, óleo de mostarda (pMO; 0.1%, 0.5% e 1%). (C) Resposta nociceptiva direta de animais naïve frente a aplicação de 50µl do agonista óleo de mostarda (1%) após a aplicação intraplantar de 40µl de veículo ou do antagonista TRPA1, HC030031 (300µg/pata) (D) Avaliação do limiar mecânico dos animais CCI em diferentes momentos após a administração de 40 µl de veículo ou de 300µg/pata do antagonista TRPA1, HC030031, no 7º dia pós-cirurgia. Valores representam Média \pm EPM, (A e B) (*) indica $p \leq 0,05$ quando comparado a medida Basal (BS) e (#) indica $p \leq 0,05$ quando comparado a medida do 14º dia (D14); (C e D) (*) indica $p \leq 0,05$ quando comparado a medida equivalente do grupo veículo.

5.4 Sensibilidade do receptor TRPM8

O agonista TRPM8, mentol (MT), foi administrado, via intraplantar, na pata ipsilateral a cirurgia, de modo a avaliar se a ativação do receptor desencadearia uma resposta nociceptiva direta (em número de *flinches*) e se tal resposta estaria afetada no modelo de neuropatia (Figura 5A). Observou-se que, em todas as concentrações MT induziu um maior número de *flinches* durante os 20 minutos pós-injeção em comparação aos respectivos controles veículo de ambos os grupos, CCI e Sham, indicando que o agonista ativou vias nociceptivas (Veículo: CCI= $16,0 \pm 4,3$, Sham= $12,6 \pm 3,3$; 0,1%: CCI= $42,1 \pm 6,0$, Sham= $51,3 \pm 9,6$; 0,5%: CCI= $38,7 \pm 7,1$, Sham= $54,3 \pm 4,5$; 1%: CCI= $34,6 \pm 9,1$,

Sham= $53,2 \pm 8,1$) ($p \leq 0,05$). Contudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre as respostas dos animais CCI e Sham que receberam MT para nenhuma das concentrações do agonista (Figura 5B-E), exceto quando foram avaliadas as respostas em intervalos de 5 minutos após administração intraplantar de MT 1%, quando observou-se que os animais do grupo CCI manifestaram uma resposta significativamente menor que a do grupo Sham nos primeiros 5 minutos pós-injeção (Figura 5F).

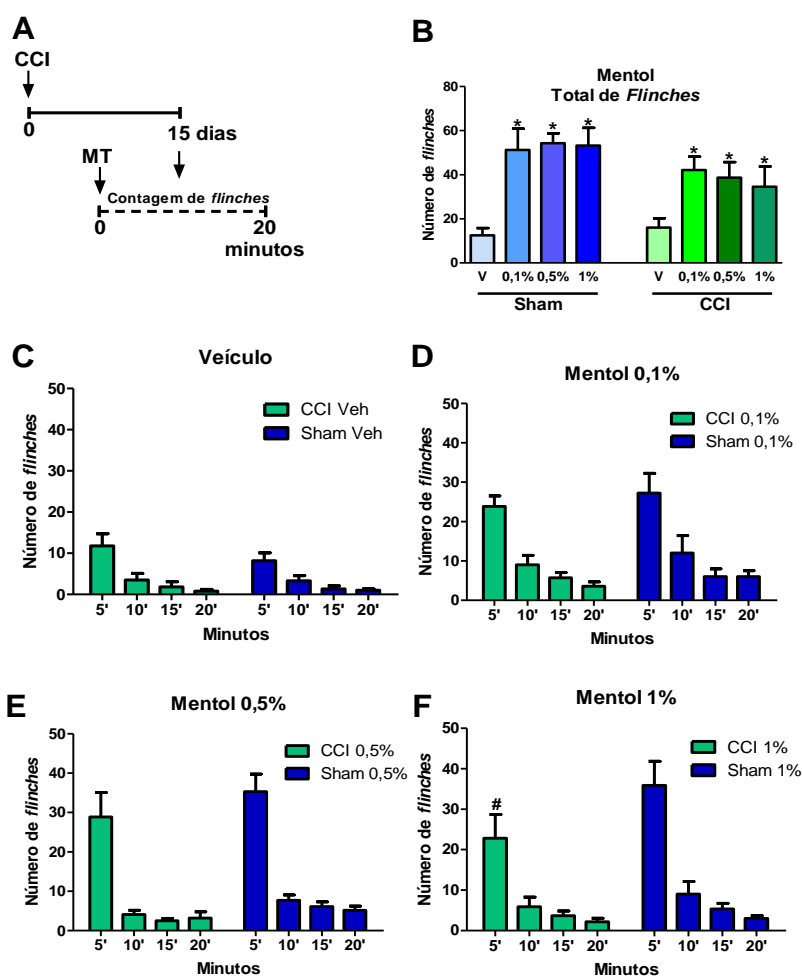


Figura 5. Efeito da aplicação intraplantar do agonista TRPM8, mentol (MT). (A) Desenho experimental: 15 dias após a realização da cirurgia os animais receberam, via intraplantar, 50µl do agonista TRPM8, mentol (MT) ou de veículo e o número de *flinches* foi quantificado durante 20 minutos; (B) Resposta nociceptiva direta (em número de *flinches*) frente a estimulação de TRPM8 por seu agonista, MT, nas concentrações de 0.1%, 0.5% e 1%; (C) Resposta frente a administração de veículo, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos; (D) Resposta nociceptiva direta frente a aplicação de óleo de mostarda 0,1%, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos; (E) Resposta nociceptiva direta frente a aplicação de óleo de mostarda 0,5%, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos; (F) Resposta nociceptiva direta frente a aplicação de óleo de mostarda 1%, com quantificação dos *flinches* de 5 em 5 minutos. Valores representam Média ± EPM, (*) indica $p \leq 0,05$

quando comparado ao grupo veículo correspondente e (#) indica $p \leq 0,05$ quando comparado ao ao grupo Sham correspondente ao mesmo *time point*.

5.5 TRPM8 e sensibilidade ao frio

Uma vez que TRPM8 é bem caracterizado como um termosensor de frio, no 15º dia pós-cirurgia, após os 20 minutos de quantificação da resposta nociceptiva direta frente a aplicação de MT, os ratos foram submetidos ao teste da placa fria, de modo a evidenciar possíveis alterações na latência de resposta ao frio frente a ativação de TRPM8. A latência de resposta dos ratos Sham foi significativamente reduzida frente a administração de MT 0,5% e 1% (Figura 6A). Por outro lado, no grupo CCI, nenhuma das concentrações de MT foi capaz de alterar significativamente a resposta dos animais a temperatura de $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ (Figura 6B).

Ademais, o efeito da inibição de TRPM8 também foi avaliado. A aplicação de 40µl do antagonista AMTB (300µg/pata, via i.pl.) se mostrou eficaz na redução da resposta nociceptiva direta de animais naïve frente a administração do agonista mentol (0,1%), indicando que a droga foi capaz de inibir as respostas mediadas por TRPM8 (Figura 6C). O efeito dessa inibição sobre a sensibilidade ao frio dos animais CCI foi determinado através do teste da placa fria, estabelecendo novamente a temperatura como $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Uma vez que o pico de redução da latência de resposta dos animais CCI ao frio foi encontrado no 10º dia pós-cirurgia, tal dia foi determinado como o *time point* para avaliação do efeito da administração intraplantar de 40µl do bloqueador AMTB, na dose de 300µg/pata. Foram realizadas medidas pré-tratamento e medidas em diferentes horas pós-tratamento. A administração de volume equivalente de veículo não alterou significativamente a sensibilidade ao frio dos animais CCI no teste da placa fria. Do mesmo modo, a análise estatística não evidenciou nenhuma alteração na latência de resposta ao frio dos animais CCI tratados com AMTB (Figura 6D).

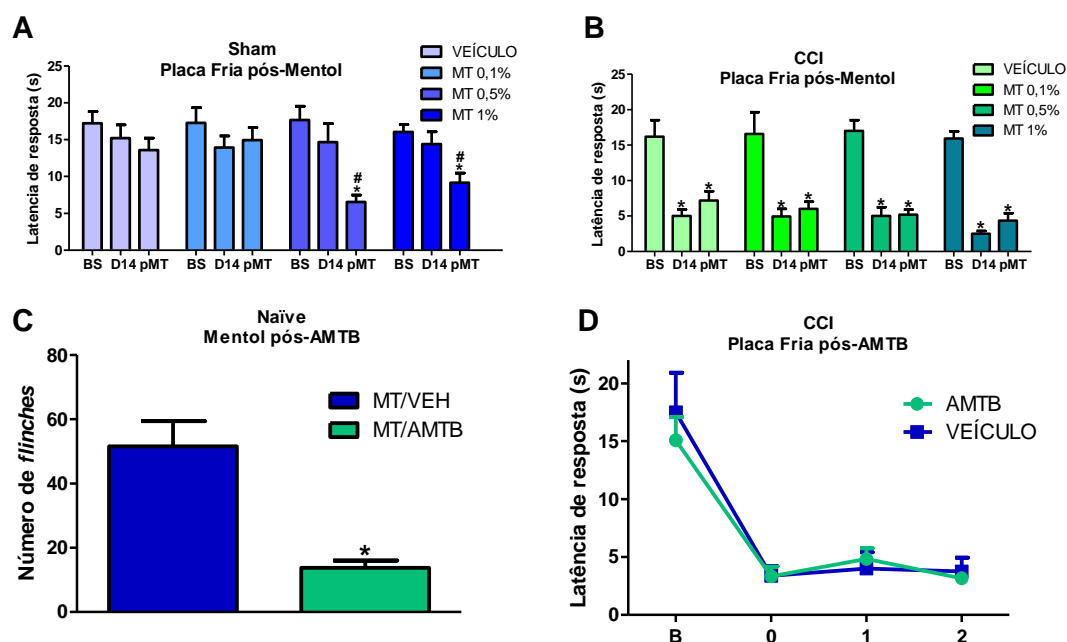


Figura 6. Manipulação farmacológica da atividade de TRPM8 e efeito sobre a latência de resposta a estímulo frio. (A) Latência de resposta ao frio no teste da placa fria (Temperatura: $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) dos animais do grupo Sham, com valores basais (BS), do 14º dia pós-cirurgia (D14) e frente a administração de diferentes concentrações do agonista TRPM8, mentol (pMT; 0.1%, 0.5% e 1%); (B) Latência de resposta ao frio no teste da placa fria (Temperatura: $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) dos animais do grupo CCI, com valores basais (BS), do 14º dia pós-cirurgia (D14) e frente a administração de diferentes concentrações do agonista TRPM8, mentol (pMT; 0.1%, 0.5% e 1%); (C) Número de *flinches* frente administração intraplantar de 50µl de mentol (0,1%) em animais naïve após a aplicação de 40µl de veículo ou do antagonista TRPM8, AMTB (300µg/pata, i.pl.); (D) Avaliação da resposta dos animais CCI no teste da placa fria (Temperatura: $4,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$) em diferentes tempos após a administração de veículo ou de 300µg/pata do antagonista TRPM8, AMTB, no 10º dia pós-cirurgia. Valores representam Média \pm EPM, (A e B) (*) indica $p \leq 0,05$ quando comparado a medida Basal (BS) e (#) indica $p \leq 0,05$ quando comparado a medida do 14º dia (D14); (C e D) (*) indica $p \leq 0,05$ quando comparado a medida equivalente do grupo veículo.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo caracterizou as respostas nociceptivas a estímulo mecânico e térmico ao frio em um modelo animal de neuropatia e determinou como a intervenção farmacológica sobre os receptores da família TRP, TRPA1 e TRPM8, afetou essas respostas.

A constrição crônica unilateral do nervo ciático, proposta em 1988 por Bennett e Xie, consiste em um modelo animal de neuropatia amplamente aceito em pesquisa pré-clínica. Em sua descrição original, os autores caracterizaram nos ratos submetidos ao procedimento a manifestação tanto de hiperalgesia térmica ao calor quanto de alodinia ao frio e inferiram a presença

de alodinia mecânica e de dor espontânea baseados em alguns comportamentos manifestados pelos animais, como guarda da pata e supressão do apetite. Tais alterações nociceptivas foram detectadas logo no segundo dia pós-cirurgia, com manutenção por até 2 meses após indução da neuropatia (Bennett & Xie, 1988). Esses achados estão de acordo com o evidenciado pelo presente estudo, no qual os animais submetidos a cirurgia para indução de dor neuropática apresentaram logo no quarto dia pós-cirúrgico uma hipersensibilidade a estímulo frio e uma alodinia mecânica evidenciada no teste Von Frey eletrônico, manifestações que estiveram presentes pelo menos por 4 semanas após a cirurgia.

Alodinia mecânica consiste em um dos principais sintomas de dor neuropática e o presente estudo evidenciou que o modelo animal empregado foi adequado para mimetizar tal manifestação, ou seja, o modelo demonstrou uma validade de face adequada para esse aspecto. Entretanto, Bennett e Xie (1988), ao realizarem o teste Randall Selitto, não encontraram diferenças significativas nas respostas manifestadas pelo grupo submetido a constrição do nervo ciático em comparação ao grupo controle, o que vai contra a premissa de que o modelo desencadearia alterações de resposta a estímulo mecânico. Por outro lado, estudos posteriores demonstraram a manifestação de alodinia mecânica no mesmo modelo de neuropatia. Estudo desenvolvido por Mika e colaboradores (2015), por exemplo, evidenciou que camundongos submetidos ao modelo CCI apresentaram uma significativa redução do limiar mecânico no teste de filamentos de Von Frey poucos dias após a cirurgia. Da mesma forma, estudos utilizando o modelo CCI em ratos também encontraram uma redução do limiar mecânico desses animais, indicando o desenvolvimento de alodinia mecânica (Su *et al.*, 2011; Austin *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2014 e Di *et al.*, 2014).

Os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de hipersensibilidade a estímulo mecânico em dor neuropática não estão completamente esclarecidos, mas nesse estudo TRPA1 é apresentado como um potencial atuante na fisiopatologia desse sintoma. TRPA1 se mostrou sensibilizado nos animais CCI, uma vez que a administração intraplantar do agonista óleo de mostarda desencadeou uma resposta nociceptiva direta exacerbada em comparação ao grupo controle Sham. Esse resultado vai contra o que foi

encontrado por Caspani e colaboradores (2009), que verificaram uma redução dos neurônios responsivos a óleo de mostarda em experimentos de imagem de cálcio em camundongos submetidos a CCI. Entretanto, essa discrepância pode ter sido desencadeada por diferenças interespecies e pelo fato de que resultados *in vitro* nem sempre mimetizam o que é indicado por métodos *in vivo*. A exemplo do demonstrado pelo presente estudo, Pinheiro *et al.* (2015) encontraram que a indução da neuropatia pelo modelo CCI em camundongos desencadeou uma resposta nociceptiva exacerbada frente a administração intraplantar do agonista TRPA1 alil-isotiocianato.

São diversos os mecanismos que podem estar relacionados a essa sensibilização de TRPA1. Considerado um integrador de sinais nociceptivos e inflamatórios, esse canal pode ser sensibilizado por mediadores inflamatórios como óxido nítrico, prostaglandinas e bradicinina e pelo neuropeptídeo dinorfina A, todos com participação na fisiopatologia de dor neuropática (Yoon *et al.*, 1998; Bandell *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2007; Kurori *et al.*, 2011; Duarte *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2013B; Dall'Acqua *et al.*, 2014; Voolstra & Huber, 2014). Espécies reativas de oxigênio, compostos que também já foram relatados como atuantes em neuropatia dolorosa (Kim *et al.*, 2004; Hassler *et al.*, 2014), também podem sensibilizar TRPA1, incluindo peróxido de hidrogênio e hipoclorito (Bessac *et al.*, 2008; Voolstra & Huber, 2014). Os mediadores que sensibilizam TRPA1 usualmente atuam via receptores acoplados a proteína Gq, levando a ativação da enzima fosfolipase C (PLC) (Than *et al.*, 2013). Essa enzima cliva o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) em inositol-1,4,5-trifostato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). PIP₂ atua como um inibidor endógeno de TRPA1 e estudos indicam que tal receptor pode ser sensibilizado através da depleção dessa molécula (Patil *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2007). De fato, estudos indicam que a enzima PLC está superativada em dor neuropática (Kusuda *et al.*, 2013), o que teria como consequência uma depleção de PIP₂ e uma redução do efeito inibitório sobre TRPA1.

Outra possibilidade para a alteração na responsividade ao agonista TRPA1 é a mudança no perfil de expressão desse receptor em fibras sensoriais. No entanto, estudos investigando o nível de expressão de TRPA1

em modelos de dor neuropática tem encontrado resultados divergentes. Enquanto Frederick e colaboradores (2007) evidenciaram um aumento na expressão do RNA mensageiro (RNAm) para TRPA1 no gânglio da raiz dorsal de ratos submetidos ao procedimento de constrição crônica unilateral do nervo ciático, estudo desenvolvido por Caspani *et al.* (2009) indicou uma significativa redução do nível de expressão desse receptor no gânglio da raiz dorsal a partir do sétimo dia pós-CCI em camundongos. Utilizando outro modelo animal de neuropatia, o de ligação das fibras espinais provenientes do gânglio L5 em ratos, Obata e colaboradores (2005) encontraram uma redução na expressão de RNAm para TRPA1 no gânglio da raiz dorsal L5 ao mesmo tempo em que houve um aumento da expressão desse receptor no gânglio da raiz dorsal L4. Staaf *et al.* (2009), por sua vez, utilizaram os modelos de *spared nerve injury* (SNI) e injúria parcial de nervo (PNI) e verificaram em ambos uma diminuição do nível de expressão de TRPA1 no gânglio da raiz dorsal.

A ativação de TRPA1 desencadeou em ambos os grupos, CCI e Sham, uma significativa redução do limiar de resposta a estímulo mecânico, o que, aliado a evidências apresentadas por outros estudos, indica o potencial desse receptor em atuar no processo de mecanossensação tanto em um contexto fisiológico quanto fisiopatológico. Bautista e colaboradores (2006) encontraram que a ativação de TRPA1 por seu agonista reduziu significativamente o limiar mecânico de camundongos e resultados semelhantes foram evidenciados em ratos por Perin-Martins *et al.* (2013) e Wei *et al.* (2010). Alguns estudos com animais *knockout* para o gene *trpa1*, encontraram uma significativa deficiência na nocicepção mecânica desses animais (Kwan *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2009).

Em um contexto patológico, TRPA1 parece mediar a hipersensibilidade mecânica desencadeada por certos compostos, como endotoxinas bacterianas, dinorfina A, carragenina, prostaglandina E2 e metilglioxal (Eberhardt *et al.*, 2012; Andersson *et al.*, 2013; Bonet *et al.*, 2013; Wei *et al.*, 2013B; Meseguer *et al.*, 2014; Dall'Acqua *et al.*, 2014). Outra evidência da participação de TRPA1 na fisiopatologia da mecanossensação envolve a via p38/MAPK. Obata e colaboradores (2005) indicaram que o fator de crescimento neuronal (NGF) induz um aumento de TRPA1 em neurônios sensoriais através dessa via e Moon *et al.* (2014) demonstraram que a via p38/MAPK participa na geração de

alodinia mecânica no modelo CCI de dor neuropática. Além disso, a via Wnt, reconhecidamente atuante em neurônios sensoriais, participa na sensibilização desses neurônios em um contexto patológico e um dos efeitos da ativação dessa via é o aumento da translocação de receptores TRPA1 para a membrana. O bloqueio de TRPA1 previne a hipersensibilidade mecânica desencadeada pela ativação de vias Wnt (Simoneti *et al.*, 2014).

No presente estudo, a inibição de TRPA1 atenuou de modo significativo a alodinia mecânica dos animais do grupo CCI. Petrus *et al.* (2007) encontraram resultados semelhantes em um modelo de dor inflamatória induzida por adjuvante completo de Freund (CFA). Em modelos de neuropatia, Pinheiro e colaboradores (2015) demonstraram que a administração sistêmica do antagonista TRPA1, HC030031, reduziu a alodinia mecânica de camundongos submetidos a CCI e, de forma semelhante, em modelo de dor neuropática de origem diabética, Wei *et al.* (2009) encontraram que o tratamento sistêmico tanto agudo quanto crônico com um bloqueador de TRPA1 atenuou a manifestação de hipersensibilidade a estímulo mecânico, assim como Eid *et al.* (2008) verificaram tanto em dor crônica induzida por CFA quanto em dor neuropática induzida por ligação de nervo espinal (SNL) uma redução da alodinia mecânica após administração via oral de HC030031. O tratamento local e intratecal com antagonista TRPA1 também demonstrou efetividade em estudos com modelos de neuropatia diabética e SNI (Wei *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2013A). Além disso, é interessante notar que estudos indicam que analgésicos clássicos, como dipirona, podem ter entre seus mecanismos a inibição de TRPA1 e atenuação de alodinia mecânica (Nassini *et al.*, 2015).

Apesar de ser proposto como um transdutor direto de estímulos mecânicos, TRPA1 pode participar de outras formas na fisiopatologia de alodinia mecânica por atuar em outros processos que podem afetar as respostas nociceptivas. Por exemplo, estudos indicam que uma disfunção vascular contribui para a geração de dor neuropática (Lim *et al.*, 2015) e TRPA1 participa na regulação vascular e pode participar na fisiopatologia da disfunção endotelial (Earley, 2012; Wei *et al.*, 2013B). Além disso, esse canal pode atuar no processo de sensibilização central. Koivisto & Pertovaara (2013) propõem que TRPA1 amplifica a transmissão glutamatérgica no corno dorsal

da medula espinal, contribuindo para a constante ativação de vias centrais de transmissão da dor, o que foi corroborado por Kosugi e colaboradores (2007), que encontraram que, após a ativação de TRPA1 por alil-isotiocianato, houve uma facilitação da ativação de neurônios glutamatérgicos da substância gelatinosa, região da medula espinal que recebe informação nociceptiva através de aferentes primários provenientes de vísceras, pele e outros órgãos.

Uma série de outras moléculas tem surgido como candidatas na indução e manutenção do quadro de alodinia mecânica, incluindo canais iônicos da família TRP. Por exemplo, Piezo2 é um mecanotransdutor cuja atividade é facilitada pela via da EPAC (*exchange protein directly activated by cAMP*), uma proteína cuja função parece estar aumentada em modelos animais de dor neuropática (Eijkelkamp *et al.*, 2013), um mecanismo que poderia contribuir para a geração de uma hipersensibilidade mecânica. Ainda nesse contexto, Wieskopf e colaboradores (2015) demonstraram que a subunidade $\alpha 6$ de receptores nicotínicos está relacionada com a variação de respostas alodínicas a estímulo mecânico em casos de neuropatia dolorosa em camundongos e humanos. Dentro da família dos TRPs, Chen e colaboradores (2014) encontraram que o tratamento sistêmico com liquiritigenina, um inibidor de receptor TRPM3, aliviou a hiperalgesia mecânica de ratos submetidos ao procedimento CCI. Outros canais dessa família que tem sido apontados como tendo propriedades mecanossensíveis incluem o termo-TRP TRPV4 e TRPC1 (Cortright *et al.*, 2007; Rychkov & Barritt, 2007). Dessa forma, outras moléculas além de TRPA1 podem atuar na fisiopatologia de alodinia mecânica em dor neuropática.

A exemplo de alodinia mecânica, a hipersensibilidade ao frio foi encontrada nos animais do grupo CCI poucos dias após o procedimento de indução da neuropatia, quando foi verificado através do teste da placa fria uma significativa redução da latência de retirada da pata. As alterações de resposta ao frio estiveram presentes por pelo menos um mês, uma vez que houve um aumento da resposta do tipo-nociceptiva dos ratos com neuropatia desde a primeira semana até a quarta semana pós-cirurgia frente a instilação plantar do estímulo refrescante acetona. De modo semelhante, Su e colaboradores (2011) evidenciaram em ratos submetidos ao modelo CCI um significativo aumento do

comportamento de retirada da pata no teste da placa fria a temperatura de $4,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ logo no quarto dia pós-cirurgia. Xing *et al.* (2007), por sua vez, encontraram uma resposta exacerbada de ratos CCI no teste da acetona a partir do terceiro dia pós-cirúrgico e tal resposta permaneceu aumentada por pelo menos 5 semanas após a indução do modelo.

John Updike escreveu em seu livro “*More Matter: Essays and Criticism*”: “Frio é uma ausência, uma ausência de calor, mas ainda assim é sentida como uma presença” (Updike, 1980). Para sentir a presença dessa ausência, neurônios sensoriais especializados são responsáveis pela detecção e transmissão da sensação de frio. Entretanto, a fisiologia da termossensação de frio não é tão bem esclarecida quanto a de calor (Tominaga & Caterina, 2004). Como exemplo pode-se citar a diferenciação de temperaturas consideradas nocivas ou inócuas. Enquanto já é bem caracterizada a existência de aferentes termosensíveis com temperaturas limiares moderadas (43°C) ou altas (52°C) (Nagy & Rang, 1999), não há uma distinção tão clara no caso da percepção térmica de frio. Em linhas gerais, temperaturas dentro da escala de frio inócuo parecem ativar tanto fibras A δ quanto fibras C, mas não se sabe exatamente a proporção de nociceptores ativados por frio nocivo (McKemy, 2005). Quanto a diferenciação de frio nocivo e inócuo, Alfonsi e colaboradores (2015) em voluntários humanos encontraram que a temperatura fria limiar para evocar dor foi de aproximadamente 13°C . Dunham *et al.* (2015), por sua vez, demonstraram em ratos que a temperatura de 14°C foi o limiar na qual os animais começaram a manifestar o comportamento de retirada da pata através de um novo método proposto pelos autores para avaliação de respostas frente a redução gradativa da temperatura. Temperaturas acima de 14°C não foram capazes de desencadear a resposta de retirada da pata nos animais (Dunham *et al.*, 2015). De modo semelhante, o presente estudo encontrou que a temperatura de 14°C foi limítrofe para a detecção de uma resposta do tipo-nociceptiva nos ratos controle Sham, sendo que temperaturas acima disso e ainda dentro da escala de frio (19°C e 24°C) não desencadearam o mesmo tipo de resposta nos animais. O grupo CCI, por outro lado, apresentou uma alteração no limiar de detecção de temperaturas nocivas, uma vez que a temperatura de 19°C passou a ser reconhecida como um frio nocivo. Esse resultado está de acordo com evidências produzidas por testes *in vitro* que

indicam um aumento da sensibilidade de neurônios responsivos ao frio em ratos submetidos ao modelo CCI (Xing *et al.*, 2007).

A sensação de frio é uma das modalidades sensoriais mais intrigantes. Dependendo do contexto fisiológico ou fisiopatológico, diferentes temperaturas dentro da escala de frio podem desencadear percepções distintas, incluindo uma simples sensação de refrescância, uma sensação dolorosa (que é muitas vezes paradoxalmente descrita como uma dor em queimação) ou até mesmo pode ter um efeito analgésico. Os mecanismos relacionados a essas diferentes respostas não estão completamente esclarecidos, mas estudos indicam que receptores da família TRP, particularmente TRPM8, podem mediar algumas dessas respostas. Em condições fisiológicas, estudos apontam a importância de TRPM8 para a termossensação de frio. McKemy *et al.* (2002) e Peier *et al.* (2002) foram os primeiros a descrever um canal da família TRP que era ativado tanto por mentol quanto por frio. Knowlton *et al.* (2010) avaliaram animais *knockout* para TRPM8 em um teste de preferência de lugar no qual haviam duas plataformas, uma a temperatura de 30°C e outra a temperaturas frias entre 30°C e 5°C. Os animais que não expressavam TRPM8 não manifestaram uma preferência pela plataforma no qual eram expostos a frio inócuo (30°C) em detrimento da plataforma de temperaturas frias nocivas, indicando que eles apresentaram uma deficiência na percepção de frio. Resultados semelhantes foram encontrados por Colburn e colaboradores (2007), que indicaram que, além de não discriminar entre temperaturas frias nocivas e temperaturas inócuas no teste de preferência de lugar, os animais *knockout* para TRPM8 também apresentaram um maior tempo de latência de retirada da pata no teste da placa fria (a 0°C). Outro estudo mostrou que um inibidor de TRPM8 extinguiu as respostas de células HEK293T que expressavam esse receptor frente a exposição a temperaturas frias (Knowlton *et al.*, 2011).

Em condições patológicas, a investigação do papel de TRPM8 em casos de neuropatia dolorosa tem encontrado resultados controversos. Caspani *et al.* (2009) encontraram que houve uma redução do nível de expressão do RNAm para esse receptor no gânglio da raiz dorsal de camundongos CCI em comparação ao grupo controle. Da mesma forma, Katsura *et al.* (2006) e Obata *et al.* (2005), utilizando o modelo SNL de dor neuropática, encontraram uma

reduzida expressão de TRPM8. Xing *et al.* (2007), Su *et al.* (2011) e Frederick *et al.* (2007), por sua vez, encontraram um significativo aumento na expressão de TRPM8 no gânglio da raiz dorsal de ratos com neuropatia induzida por CCI. Em tecidos humanos, Facer *et al.* (2007) encontraram uma menor expressão de TRPM8 em casos de injúria de nervo particularmente em porções distais à injúria. Quanto a sensibilidade do receptor em casos de dor neuropática, Xing *et al.* (2007) demonstraram em estudos *in vitro* uma maior responsividade de neurônios sensíveis a mentol de ratos submetidos a CCI frente a aplicação do agonista TRPM8, o que está de acordo com estudo desenvolvido por Caspani *et al.* (2009), que indicou que a aplicação de 40µl de mentol em camundongos submetidos ao modelo CCI induziu uma resposta significativamente maior que a dos animais controle. Contudo, em discordância com esses achados, no presente estudo não foi encontrada qualquer diferença nas respostas dos animais CCI em comparação ao grupo Sham frente a administração intraplantar de mentol. Essas divergências podem ser devidas a diferenças interespecies ou devido a diferenças na concentração de mentol aplicada (0.1%, 0.5% e 1% no caso desse estudo e 3.9% no caso do estudo de Caspani *et al.*).

Wasner e colaboradores (2004) demonstraram que a aplicação local de mentol em sujeitos normais desencadeia uma hiperalgesia ao frio. Dessa forma, no presente estudo, foi investigado se a ativação de TRPM8 através da aplicação intraplantar de mentol alteraria as respostas comportamentais dos animais no teste da placa fria. Em concordância com o encontrado por Wasner *et al.* em humanos, houve uma redução da latência de retirada da pata dos animais Sham. No entanto, nos ratos CCI não foi detectada qualquer alteração comportamental quanto a resposta ao estímulo frio ($4,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$). Por outro lado, Su *et al.* (2011) encontraram que mentol nos animais controle não ocasionou qualquer alteração no teste da placa fria, enquanto que no grupo de animais submetidos ao modelo CCI houve uma significativa exacerbação da resposta no mesmo teste. Contudo, a via de administração da droga foi diferente (via intratecal), o que pode explicar a divergência dos resultados. Completando o cenário de resultados conflitantes, Proudfoot *et al.* (2006) demonstraram em ratos que a aplicação tanto intratecal quanto tópica de mentol produziu uma analgesia tanto para estímulos térmicos de calor quanto para estímulos

mecânicos. Adicionalmente, Patel *et al.* (2014) demonstraram no modelo SNL de dor neuropática em ratos, um efeito analgésico da aplicação local de mentol sobre as respostas de hipersensibilidade ao frio, com uma significativa redução da resposta dos animais no teste da acetona, ao mesmo tempo em que não foi observado efeito na alodinia mecânica. Essa diversidade de resultados pode ser devida a variedade de possíveis efeitos fisiológicos do mentol. Além de ativar TRPM8, essa substância também sensibiliza TRPV3 ao mesmo tempo em que desensibiliza TRPA1 e TRPV1 (Andersen *et al.*, 2014). Ademais, já foi demonstrado que mentol é capaz de inibir correntes mediadas pelo receptor 5-HT₃ de serotonina (um neurotransmissor com participação na transmissão nociceptiva) (Ashoor *et al.*, 2013). Mais ainda, Zhang *et al.* (2008) evidenciam em células hipocâmpais em cultura que mentol é capaz de agir como um facilitador da transmissão GABAérgica e ainda ativar diretamente o receptor GABA_A e drogas anticonvulsivantes com atividade anti-nociceptiva atuam através de mecanismos semelhantes. O efeito analgésico de mentol já foi proposto como sendo dependente de receptores glutamatérgicos metabotrópicos dos grupos II/III, que responderiam a transmissão aferente mediada pela ativação de TRPM8 através da inibição de fibras nociceptivas de segunda ordem (Proudfoot *et al.*, 2006). Além disso, Gaudioso *et al.* (2012) demonstraram *in vitro* que mentol é capaz de inibir canais de Na⁺ dependentes de voltagem, o que eles sugerem como o possível mecanismo da analgesia mediada por mentol.

O bloqueio de TRPM8 não foi capaz de alterar as respostas dos animais CCI no teste da placa fria. Resultado equivalente foi encontrado por Katsura *et al.* (2006), que demonstraram que o *knock-down* de TRPM8 em ratos submetidos a SNL não foi capaz de reduzir a manifestação de hiperalgesia ao frio. Todavia, em conflito com esses achados, alguns estudos sugerem que o bloqueio ou o *knock-down* do receptor TRPM8 atenua a hipersensibilidade ao frio em modelos animais de dor neuropática (Xing *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2011; Knowlton *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados pelo presente estudo não suportam a hipótese de que TRPM8 teria um papel relevante na manifestação de hipersensibilidade térmica ao frio em dor neuropática. Isso pode ser explicado em parte por certas alterações fisiopatológicas que ocorrem no quadro de

neuropatia dolorosa que podem interferir com a função desse canal. Por exemplo, TRPM8 é inibido por mediadores inflamatórios comumente implicados em dor neuropática, como bradicinina e prostaglandinas (Yudin & Rohacs, 2012; Than *et al.*, 2013). Muitos desses mediadores agem através da ativação de receptores acoplados a proteína Gq, a qual leva a ativação de PLC e geração de DAG e IP₃ a partir da clivagem do PIP₂. TRPM8 é ativado por PIP₂ e existem estudos que indicam, inclusive, que a ativação desse receptor por frio ou mentol é dependente da presença de PIP₂ e que tais estímulos aumentam a afinidade de TRPM8 por seu ativador endógeno (Rohács *et al.*, 2005; Zakharian *et al.*, 2010). Uma vez que existem evidências de que há um aumento da função da enzima PLC em um quadro de dor neuropática (Kusuda *et al.*, 2013), os níveis de PIP₂ podem estar diminuídos e, dessa forma, a ativação de TRPM8 pode estar limitada.

Existem outras moléculas candidatas como atuantes na fisiopatologia de hipersensibilidade ao frio. TREK2, por exemplo, é um canal de potássio sensível a temperaturas entre 20°C e 25°C que parece ter um papel importante na alodinia ao frio que caracteriza o quadro neuropático associado ao tratamento com o droga anti-cancerígena oxaliplatina (Pereira *et al.*, 2014). O próprio receptor TRPA1 se destaca como um potencial alvo para tratamento de manifestações hiperalgésicas ao frio. Estudo desenvolvido por Story *et al.* (2003) foi o pioneiro em propor a ação de TRPA1 como um sensor de frio nocivo, apesar de existirem controvérsias quanto a real participação desse receptor na termossensação de frio (Knowlton *et al.*, 2010; Bautista *et al.*, 2006). Alguns autores propõem que a ativação de TRPA1 por frio nocivo mediará a sensação de dor em queimação relatada por pacientes quando expostos a temperaturas frias (Kwan & Corey, 2009). Isso motivou a investigação do papel desse canal da fisiopatologia de manifestações de hipersensibilidade ao frio. Katsura *et al.* (2006), por exemplo, demonstrou que o *knock-down* de TRPA1 em ratos submetidos ao procedimento de SNL reduziu significativamente a resposta dos animais no teste de placa fria, com temperatura mantida em 5.0±0.5°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Obata *et al.* (2005), que também demonstrou que a manifestação de hiperalgesia ao frio coincidiu com um aumento de expressão de TRPA1 no gânglio da raiz dorsal em L4 de ratos com neuropatia induzida

pelo modelo SNL. Outros estudos demonstraram que o bloqueio farmacológico de TRPA1 foi capaz de reduzir respostas alodínicas ao frio em animais com neuropatia (Pinheiro *et al.*, 2015; Trevisane *et al.*, 2014), apesar de outros autores proporem que TRPA1 não contribui diretamente na patogênese de alodinia ao frio (Caspani *et al.*, 2009). Considerando que o presente estudo evidenciou um aumento da sensibilidade de TRPA1, é possível que esse receptor tenha participação nas manifestações de hipersensibilidade ao frio evidenciadas nos animais com neuropatia induzida pelo modelo CCI.

Em suma, dados do presente estudo corroboram a hipótese de que o receptor TRPA1 tem uma significativa relevância na fisiopatologia de alodinia mecânica no modelo de dor neuropática induzida pela constrição crônica do nervo ciático. A participação de TRPM8 na hipersensibilidade ao frio, entretanto, não foi evidenciada nos protocolos empregados nesse estudo, o que não indica uma contribuição direta desse receptor para a patogênese desse sinal no modelo de dor neuropática utilizado. No entanto, outros estudos são necessários, empregando outros protocolos experimentais e outras metodologias, para determinar o real papel desses receptores, especialmente TRPM8, na fisiopatologia de dor neuropática.

7 CONCLUSÕES

As manifestações de hipersensibilidade nociceptiva a estímulo mecânico e frio em ratos com neuropatia induzida pelo modelo CCI foram evidenciadas logo nos primeiros dias pós-cirurgia e se mantiveram por pelo menos um mês após o procedimento de indução da neuropatia. Isso demonstra que o modelo mostrou uma validade de face adequada por mimetizar o surgimento de dois dos principais sintomas relatados por pacientes com dor neuropática, a alodinia mecânica e a hipersensibilidade ao frio.

O receptor TRPA1 se mostrou sensibilizado nos animais com neuropatia e sua ativação desencadeou uma redução significativa dos limiares mecânicos tanto dos animais submetidos ao modelo CCI quanto nos animais Sham, corroborando a hipótese que tal receptor participa no processo de mecanotransdução. Além disso, a inibição do receptor TRPA1 foi capaz de atenuar a alodinia mecânica dos animais CCI. Esses achados, aliados a outros

dados da literatura, sugerem um importante papel de TRPA1 na fisiopatologia de dor neuropática e, especificamente, de alodinia mecânica, evidenciando tal receptor como um potencial alvo para intervenção farmacológica em casos de dor neuropática.

Já o receptor TRPM8 não apresentou uma diferença de sensibilidade entre os grupos controle e CCI e sua ativação alterou a resposta de hipersensibilidade ao frio apenas dos animais Sham. Esses resultados, aliados ao fato de que a inibição de TRPM8 não foi capaz de atenuar a sensibilidade a estímulo frio nos animais CCI, não corroboram a hipótese de que tal receptor teria uma implicância relevante na manifestação de respostas anormalmente sensíveis ao frio em dor neuropática. Outros canais, incluindo o próprio receptor TRPA1, podem participar na fisiopatologia desse sintoma.

Os receptores TRP tem demonstrado uma importância significativa na pesquisa com modelos animais de dor neuropática e o presente estudo traz evidências que indicam um importante papel especialmente do receptor TRPA1 na manifestação de alodinia mecânica em um modelo de dor neuropática de origem traumática. A investigação do efeito da manipulação farmacológica de TRPM8 não trouxe resultados que corroborassem a participação desse receptor no mesmo modelo de neuropatia. Entretanto, estudos mais detalhados utilizando outros modelos animais de neuropatia e outros protocolos para a avaliação de respostas nociceptivas são necessários para a melhor descrição da participação desses canais na fisiopatologia de dor neuropática.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFONSI, P., ADAM, F., BOUHASSIRA, D. Thermoregulation and pain perception: Evidence for a homeostatic (interocetive) dimension of pain. **European Journal of Pain**, 2015.
- ANDERSEN, H.H., OLSEN, R.V., MOLLER, H.G., ESKEKUND, P.W., GAZERANI, P., ARENDT-NIELSEN, L. A review of topical high-concentration L-menthol as a translational model of cold allodynia and hyperalgesia. **European Journal of Pain**, 18, 315-325, 2014.
- ANDERSSON, D.A., GENTRY, C., LIGHT, E., VASTANI, N., VALLORTIGARA, J., BIERHAUS, A., FLEMING, T., BEVAN, S. Methylglyoxal Evokes Pain by Stimulating TRPA1. **PLoS ONE**, 8(10), 2013.

- ASHOOR, A., NORDMAN, J.C., VELTRI, D., YANG, K-H. S., SHUBA, Y., AL KURY, L., SADEK, B., HOWARTH, F.C., SHEBU, A., KANNANI, N., OZ, M. Menthol inhibits 5-HT₃ receptor-mediated currents. **The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics**, 347, 398-409, 2013.
- AUSTIN, P.J., WU, A., MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the Sciatic Nerve and Pain Hypersensitivity Testing in Rats. **J. Vis. Exp.**, (61), 2012.
- BANDELL, M., STORY, G.M., HWANG, S.W., VISWANATH, V., EID, S.R., PETRUS, M.J., EARLEY, T.J., PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, 41, 849-857, 2004.
- BARALDI, P.G., PRETI, D., MATERAZZI, S., GEPPETTI, P. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Channel as Emerging Target for Novel Analgesics and Anti-Inflammatory Agents. **J. Med. Chem.**, 53, 5085–5107, 2010.
- BARON, R., BINDER, A., WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet Neurology**, 9, 807-819, 2010.
- BARON, R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain – a clinical perspective. **Nature Clinical Practice**, 2(2), 2006.
- BAUTISTA, D.M., JORDT, S-E., NIKAI, T., TSURUDA, P.R., READ, A.J., POBLETE, J., YAMOA, E.N., BASBAUM, A.I., JULIUS, D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell**, 124, 1269-1282, 2006.
- BENEMEI, S., PATACCHINI, R., TREVISANI, M., GEPPETTI, P. TRP channels. **Current Opinion in Pharmacology**, 22, 18-23, 2015.
- BENNETT, G.L. & XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, 33(1), 87-107, 1988.
- BESSAC, B.F. & FLEIG, A. TRPM7 channel is sensitive to osmotic gradients in human kidney cells. **J Physiol**, 582(3), 1073-1086, 2007.
- BESSAC, B.F., SIVULA, M., VON HEHN, C.A., ESCALERA, J., COHN, L., LORDT, S-E. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. **The Journal of Clinical Investigation**, 118(5), 1899-1910, 2008.
- BINDER, A., MAY, D., BARON, R., MAIER, C., TOLLE, T.R., TREEDE, R.D., BERTHELE, A., FALTRACO, F., FLOR, H., GIERTHMUHLEN, J., HAENISCH, S., HUGE, V., MAGERL, W., MAIHOFNER, C., RICHTER, H., ROLKE, R., SCHERENS, A., UÇEYLER, N., WASNER, G., ZHU, J., CASCORBI. Transient Receptor Potential Channel Polymorphisms Are Associated with the Somatosensory Function in Neuropathic Pain Patients. **PLoS ONE**, 6(3), 2011.
- BODKIN, J.V. & BRAIN, S.D. Transient receptor potential ankyrin 1: emerging pharmacology and indications for cardiovascular biology. **Acta Physiologica**, 203, 87–98, 2011.
- BONET, I.J.M., FISHER, L., PARADA, C.A., TAMBELI, C.H. The role of transient receptor potential A1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-j-induced hyperalgesia. **Neuropharmacology**, 65, 206-212, 2013.

- CASPANI, O. & HEPPENSTALL, P.A. TRPA1 and Cold Transduction: An Unresolved Issue? **The Journal of General Physiology**, 133(3), 245-249, 2009.
- CASPANI, O., ZURBORG, S., LABUZ, D., HEPPENSTALL, P.A. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PLoS One**, 4 (10), e7383, 2009.
- CHANG, P.C., POLLEMA-MAYS, S.L., CENTENO, M.V., PROCISSI, D., CONTINI, M., BARIA A.T., MARTINA M., APKARIAN, A.V. Role of the nucleus accumbens in neuropathic pain: Linked multi-scale evidence in the rat transitioning to neuropathic pain. **Pain**, 155, 1128-1139, 2014.
- CHEN, J., KANG, D., XU, J., LAKE, M., HOGAN, J.O., SUN, C., WALTER, K., YAO, B., KIM, D. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. **Nature Communications**, 4, 2501, 2013.
- CHEN, L., CHEN, W., QIAN, X., FANG, Y., ZHU, N. Liquiritigenin alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. **Scientific Reports**, 5676(4), 2014.
- COLBURN, R.W., LUBIN, M.L., STONE, M.L., WANG, Y., LAWRENCE, D., D'ANDREA, M.R., BRANDT, M.R., LIU, Y., FLORES, C.M., QIN, N. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. **Neuron**, 54, 379-386, 2007.
- CORTRIGHT, D.N., KRAUSE, J.E., BROOM, D.C. TRP channels and Pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1772, 978-988, 2007.
- COSENS, D.J. & MANNING, A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. **Nature**, 224, 285-287, 1969.
- CUFFE, J.S.M., STEANE, S., MORITZ, K.M., PARACICINI, T.M. Differential mRNA expression and glucocorticoid-mediated regulation of TRPM6 and TRPM7 in the heart and kidney throughout murine pregnancy and development. **PLoS ONE**, 10(2), 2015.
- DAI, Y., WANG, S., TOMINAGA, M., YAMAMOTO, S., FUKUOKA, T., HIGASHI, T., KOBAYASHI, K., OBATA, K., YAMANAKA, H., NOGUCHI, K. Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. **Journal of Clinical Investigation**, 117(7), 1979-1987, 2007.
- DALL'ACQUA, M.C., BONET, I.J.M., ZAMPRONIO, A.R., Tambeli, C.H., PARADA, C.A., FISHER, L. The contribution of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) to the *in vivo* nociceptive effects of prostaglandin E₂. **Life Sciences**, 105, 7-13, 2014.
- DAVIS, M.P. What is new in Neuropathic Pain? **Support Care Cancer**, 15, 363-372, 2007.
- DHAKA, A., MURRAY, A.N., MATHUR, J., EARLEY, T.J., PETRUS, M.J., PATAPOUTIAN, A. TRPM8 Is Required for Cold Sensation in Mice. **Neuron Report**, 54, 371-378, 2007.
- DI, Y.X., HONG, C., JUN, L., RENSHAN, G., QINQUAN, L. Curcumin attenuates mechanical and thermal hyperalgesia in chronic constrictive injury model of neuropathic pain. **Pain Ther**, 3, 59-69, 2014.

- DUARTE, P.C., ST-JACQUES, B., MA, W. Prostaglandin E2 contributes to the synthesis of brain-derived neurotrophic factor in primary sensory neuron in ganglion explant cultures and in a neuropathic pain model. **Experimental Neurology**, 234, 466-481, 2012.
- DUNHAM, J.P., HULSE, R.P., DONALDSON, L.F. A novel method for delivering ramped cooling reveals rat behaviours at innocuous and noxious temperatures: A comparative human psychophysics and rat behavior. **Journal of Neuroscience Methods**, 249, 29-40, 2015.
- EARLEY, S. TRPA1 channels in the vasculature. **British Journal of Pharmacology**, 167(1), 13-22, 2012.
- EBERHARDT, M.J., FILIPOVIC, M.R., LEFFLER, A., DE LA ROCHE, J., KISTNER, K., FISHER, M.J., FLEMING, T., ZIMMERMANN, K., IVANOVIC-BURMAZOVIC, I., NAWROTH, P.P., BIERHAUS, A., REEH, P.W., SAUER, S.K. Methylglyoxal Activates Nociceptors through Transient Receptor Potential Channel A1 (TRPA1): A possible mechanism of metabolic neuropathies. **The Journal of Biological Chemistry**, 287, 34, 28291-28306, 2012.
- EID, S.R., CROWN, E.D., MOORE, E.L., LIANG, H.A., CHOONG, K., DIMA, S., HENZE, D.A., KANE, S.A., URBAN, M.O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Molecular Pain**, 4(48), 2008.
- EIJKELKAMP, N., LINLEY, J.E., TORRES, J.M., BEE, L., DICKENSON, A.H., GRINGHUIS, M., MINETT, M.S., HONG, G.S., LEE, E., OH, U., ISHIKAWA, Y., ZWARTKUIS, F.J., COX, J.J., WOOD, J.N. A role for Piezo2 in EPAC-dependent mechanical allodynia. **Nature Communications**, 1682(4), 2013.
- FACER, P., CASULA, M.A., SMITH, G.D., BENHAM, C.D., CHESSEL, I.P., BOUNTRA, C., SINISI, M., BIRCH, R., ANAND, P. Differential expression of the capsaicin receptor TRPV1 and related novel receptors TRPV3, TRPV4 and TRPM8 in normal human tissues and changes in traumatic and diabetic neuropathy. **BMC Neurology**, 11(7), 2007.
- FERNANDES, E.S., FERNANDES, M.A., KEEBLE, J.E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **British Journal of Pharmacology**, 166, 510–521, 2012.
- FERREIRA, J., BEIRITH, A., MORI, M.A., ARAÚJO, R.C., BADER, M., PESQUERO, J.B., CALIXTO, J.B. Reduced nerve injury-induced neuropathic pain in kinin B1 receptor knock-out mice. **J Neurosci**, 25(9), 2405-2412, 2005.
- FINNERUP, N.B., SINDRUP, S.H., JENSEN, T.S. Chronic neuropathic pain: mechanisms, drug targets and measurement. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 21, 129–136, 2007.
- FLOCKERZI, V. An Introduction on TRP channels. In: FLOCKERZI, V., NILIUS, B. **Transient Receptor Potential (TRP) channels**. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2007. 1-19. Handbook of Experimental Pharmacology.
- FREDERICK, J., BUCK, M.E., MATSON, D.J., CORTRIGHT, D.N. Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 358, 1058-1064, 2007.

- GARCÍA-ÁÑOVEROS, J. & NAGATA, K. TRPA1. In: FLOCKERZI, V., NILIUS, B. **Transient Receptor Potential (TRP) channels**. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2007. 347-362, Handbook of Experimental Pharmacology.
- GAUDIOSO, C., HAO, J., MARTIN-EAUCCLAIRE, M-F, GABRIAC, M., DELMAS, P. Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels. **Pain**, 153, 473-484, 2012.
- GILRON, I., WATSON, C.P.N., CAHILL, C.M., MOULIN, D.E. Neuropathic pain: a practical guide for the clinician. **CMAJ**, 175(3), 265-275, 2006.
- HARDIE, R.C. & MINKE, B. The *trp* gene is essential for a light-activated Ca^{2+} channel in *Drosophila* photoreceptors. **Neuron**, 8, 643-651, 1992.
- HASSLER, S.N., JOHNSON, K.M., HULSEBOSCH, C.E. Reactive oxygen species and lipid peroxidation inhibitors reduce mechanical sensitivity in a chronic pain model of spinal cord injury in rats. **J Neurochem**, 131(4), 413-417, 2014.
- HU, Q., FANG, L., LI F., THOMAS, S., YANG, Z. Hyperbaric oxygenation treatment alleviates CCI-induced neuropathic pain and decreases spinal apoptosis. **European Journal of Pain**, 2014.
- IASP TAXONOMY. Disponível em: <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576>. Acesso em: 03/06/2015.
- JAUQUEMAR, D., SCHENKER, T., TRUEB, B. An Ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. **The Journal of Biological Chemistry**, 274(11), 7325-7333, 1999.
- JENSEN, T.S., GOTTRUP, H., SINDRUP, S.H., BACH, F.W. The clinical picture of neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, 429, 1-11, 2001.
- JULIUS, D. TRP channels and Pain. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 29, 355-389, 2013.
- KATSURA, H., OBATA, K., MIZUSHIMA, T., YAMANAKA, H., KOBAYASHI, K., DAI, Y., FUKUOKA, T., TOKUNAGA, A., SAKAGAMI, M., NOGUSHI, K. Antisense knock-down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. **Experimental Neurology**, 200, 112-123, 2006.
- KIM, D., CAVANAUGH, E.J., SIMKIN, D. Inhibition of transient receptor potential A1 channel by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. **Am J Physiol Cell Physiol**, 295, C92-C99, 2008.
- KIM, H.K., PARK, S.K., ZHOU, J.L., TAGLIALATELA, G., CHUNG, K., COGGESHALL, R.E., CHUNG, J.M. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, 111(1-2), 116-124, 2004.
- KINDT, K.S., VISWANATH, V., MACPHERSON, L., QUAST, K., HU, H., PATAPOUTIAN, A., SCHAFER, W.R. *Caenorhabditis elegans* TRPA1 functions in mechanosensation. **Nature Neuroscience**, 10(5), 568-577, 2007.

- KNOWLTON, W.M., BIFOLCK-FISHER, A., BAUTISTA, D.M., MCKEMY, D.D. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics *in vivo*. **Pain**, 150, 340-350, 2010.
- KNOWLTON, W.M., DANIELS, R.L., PALKAR, R., MCCOY, D.D., MCKEMY, D.D. Pharmacological blockade of TRPM8 ion channels alters cold and cold pain responses in mice. **PLoS One**, 6(9), e25894-e25906, 2011.
- KNOWLTON, W.M. & MCKEMY, D.D. TRPM8: from cold to cancer, peppermint to pain. **Curr Pharm Biotechnol**, 12(1), 58-77, 2011.
- KOBAYASHI, K., FUKUAKA, T., OBATA, K., YAMANAKA, H., DAI, Y., TOKUNAGA, A., NOGUSHI, K. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J. Comp. Neurol.**, 493(4), 596-606, 2005.
- KOIVISTO, A. & PERTOVAARA, A. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) ion channel in the pathophysiology of peripheral diabetic neuropathy. **Scandinavian Journal of Pain**, 4, 129-136, 2013.
- KOIVISTO, A., HUKKANEN, M., SAARNILEHTO, M., CHAPMAN, H., KUOKKANEN, K., WEI, H., VIISANEN, H., AKERMAN, K.E., LINDSTEDT, K., PERTOVAARA, A. Inhibiting TRPA1 ion channel reduces loss of cutaneous nerve fiber function in diabetic animals: Sustained activation of the TRPA1 channel contributes to the pathogenesis of peripheral diabetic neuropathy. **Pharmacological Research**, 65, 149-458, 2012.
- KOIVISTO, A., CHAPMAN, H., JAVALA, N., KORJAMO, T., SAARNILEHTO, M., LINDSTEDT, K., PERTOVAARA. TRPA1: A Transducer and Amplifier of Pain and Inflammation. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, 114, 50-55, 2014.
- KOSUGI, M., NAKATSURA, T., FUJITA, T.M KURODA, Y., KUMAMOTO, E. Activation of TRPA1 Channel Facilitates Excitatory Synaptic Transmission in Substantia Gelatinosa Neurons of the Adult Rat Spinal Cord. **The Journal of Neuroscience**, 27(16), 4443-4451, 2007.
- KURORI, S., MATSUMURA, S., OKUDA-ASHITAKA, E., KATANO, T., AUDOLY, L.P., URADE, Y., ITO, S. A novel role of prostaglandin E2 in neuropathic pain: blockade of microglial migration in the spinal cord. **Glia**, 59, 208-218, 2011.
- KUSUDA, R., RAVANELLI, M.I., CADETTI, F., FRANCIOSI, A., PREVIDELLI, K., ZANON, S., LUCAS, G. Long-term antidepressant treatment inhibits neuropathic pain-induced CREB and PLC γ -1 phosphorylation in the mouse spinal cord dorsal horn. **The Journal of Pain**, 14(10), 1162-1172, 2013.
- KWAN, K.Y., ALLCHORNE, A.J., CHRISTENSEN, A.P., ZHANG, D-S., WOOLF, C.J., COREY, D.P. TRPA1 contributes to cold, mechanical and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. **Neuron**, 50(2), 277-289, 2006.
- KWAN, K.Y. & COREY, D.P. Burning cold: Involvement of TRPA1 in noxious cold sensation. **J Gen Physiol**, 133(3), 251-256, 2009.

- KWAN, K.Y., GLAZER, J.M., COREY, D.P., RICE, F.L., STUCKY, C.L. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. **The Journal of Neuroscience**, 29(15), 4808-4819, 2009.
- LAI, J., LUO, M.C., CHEN, Q., MA, S., GARDELL, L.R., OSSIPOV, M.H., PORRECA, F. Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. **Nature Neuroscience**, 9(12), 1534-1540, 2006.
- LEVINE, J.D. & ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: Targets for the relief of pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1772, 989-1003, 2007.
- LI, Y., JIA Y-C., CUI, K., LI, N., ZHENG, Z-Y., WANG, Y-Z, YUAN X-B. Essential role of TRPC channels in the guidance of nerve growth cones by brain-derived neurotrophic factor. **Nature**, 434, 894-898, 2005.
- LIM, T.K.Y., SHI, X.Q., JOHNSON, J.M., RONE, M.B., ANTEL, J.P., DAVID, S., ZHANG, J. Peripheral nerve injury induces persistent vascular dysfunction and endoneurial hypoxia, contributing to the genesis of neuropathic pain. **The Journal of Neuroscience**, 35(8), 3346-3359, 2015.
- MCKEMY, D.D. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. **Molecular Pain**, 16(1), 2005.
- MCKEMY, D.D., NEUHAUSSER, W.M., JULIUS, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. **Nature**, 416, 52–58, 2002.
- MESEGUER, V., ALPIZAR, Y.A., LUIS, E., TAJADA, S., DENLINGER, B., FAJARDO, O., MANENSCHIJN, J-A., FERNÁNDEZ-PEÑA, C., TALAVERA, A., KICHKO, T., NAVIA, B., SÁNCHEZ, A., SEÑARIS, R., REEH, P., PÉREZ-GARCIA, M.T., LÓPEZ-LÓPEZ, J.R., VOETS, T., BELMONTE, C., TALAVERA, K., VIANA, F. TRPA1 channels mediate acute neurogenic inflammation and pain produced by bacterial endotoxins. **Nature Communications**, 3125 (5), 2014.
- MIKA, J., JURGA, A.M., STARNOWSKA, J., WASYLEWSKI, M., ROJEWSKA, E., MAKUCH, W., KWIATKOWSKI, K., MALEK, N., PRZEWLOCKA, B. Effects of chronic doxepin and amitriptyline administration in naïve mice and in neuropathic pain mice model. **Neuroscience**, 294, 38-50, 2015.
- MINKE, B., WU, C-F., PAK, W.L. Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. **Nature**, 258, 84-87, 1975.
- MONTELL, C., BIRNBAUMER, L., FLOCKERZI, V., BINDELS, R.J., BRUFORD, E.A., CATERINA, M.J., CLAPHAM, D.E., HARTENECK, C., HELLER S., JULIUS, D., KOJIMA, I., MORI, Y., PENNER, R., PRAWITT, D., SCHARENBERG, A.M., SCHULTZ, G., SHIMIZU, N., ZHU, M.X. A unified nomenclature of TRP cation channels. **Molecular Cell**, 9, 229-231, 2002.
- MONTELL, C. & RUBIN G.M. Molecular characterization of the *Drosophila trp* locus: A putative integral membrane protein required for phototransduction. **Neuron**, 2, 1313-1323, 1989.
- MOON, J.Y., ROH, D.H., YOON, S.Y., CHOI, S.R., KWON, S.G., CHOI, H.S., KANG, S.Y., HAN, H.J., BEITZ, A.J., OH, S.B., LEE, J.H. δ -receptors activate astrocytes via p38 MAPK phosphorylation leading to the development of mechanical

- allodynia in a mouse model of neuropathic pain. **Br J Pharmacol**, 171(24), 5881-5897, 2014.
- MORI, M.X., ITSUKI, K., HASE, H., SAWAMURA, S., KUROKAWA, T., MORI, Y., INOUE, R. Dynamics of receptor-operated Ca^{2+} currents through TRPC channels controlled via the $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -PLC signaling pathway. **Frontiers in Pharmacology**, 6 (22), 2015.
- MUTSO, A.A., RADZIZKI, D., BALIKI, M.N., HUANG, L., BANIADR G., CENTENO, M.V., RADULOVIC, J., MARTINA, M., MILLER, R.J., APKARIAN A.V. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. **The Journal of Neuroscience**, 32(17), 5747-5756, 2012.
- NAGY, I. & RANG, H. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, 88(4), 995-997, 1999.
- NASSINI, R., FUSI, C., MATERAZZI, S., COPPI, E., TUCCINARDI, T., MARONE, I.M., DE LOGU, F., PRETI, D., TONELLO, R., CHIARUGI, A., PATACCHINI, R., GEPPETTI, P., BENEMEI, S. The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. **British Journal of Pharmacology**, 2015.
- NICKEL, F.T., SEIFERT, F., LANZ, S., MAIHÖFNER, C. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, 22, 81–91, 2012.
- OBATA, K., KATSURA, H., MIZUSHIMA, T., YAMANAKA, H., KOBAYASHI, K., DAÍ, Y., FUKUOKA, T., TOKUNAGA, A., TOMINAGA, M., NOGUCHI, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **The Journal of Clinical Investigation**, 115(9), 2393-2401, 2005.
- PATAPOUTIAN, A., TATE S., WOOLF, C.J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews**, 8, 55-68, 2009.
- PATEL, R., GONÇALVESM L., LEVERIDGE, M. MACK, S.R., HENDRICK, A., BRICE, N.L., DICKENSON, A.H. Anti-hyperalgesic effects of a novel TRPM8 agonist in neuropathic rats: A comparison with topical menthol. **Pain**, 155, 2097-2107, 2014.
- PATIL, M.J., BELUGIN, S., AKOPIAN, A.N. Chronic alteration in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate levels regulates capsaicin and mustard oil responses. **Journal of Neuroscience Research**, 89, 945-954, 2011.
- PEIER, A.M., MOQRICH, A., HERGARDEN, A.C., REEVE, A.J., ANDERSSON, D.A., STORY, G.M., EARLEY, T.J., DRAGONI, I., MCINTYRE, P., BEVAN, S., PATAPOUTIAN, A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. **Cell**, 108(5), 705-715, 2002.
- PEREIRA, V., BUSSEROLLES, J., CHRISTIN, M., DEVILLIERS, M., POUPON, L., LEGHA, W., ALLOUI, A., AISSOUNI, Y., BOURINET, E., LESAGE, F., ESCHALIER, A., LAZDUNSKI, M., NOËL, J. Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. **Pain**, 155(12), 2534-2544, 2014.
- PERIN-MARTINS, A., TEIXEIRA, J.M., TAMBELI, C.H., PARADA, C.A., FISHER, L. Mechanisms underlying transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1)-mediated

- hyperalgesia and edema. **Journal of the Peripheral Nervous System**, 18, 62-74, 2013.
- PETRUS, M., PEIER, A.M., BANDELL, M., HWANG, S.W., HUYNH, T., OLNEY, N., JEGLA, T., PATAPOUTIAN, A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Molecular Pain**, 3(40), 2007.
- PHILLIPS, A.M., BULL, A., KELLY, L.E. Identification of a *Drosophila* gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the *trp* phototransduction gene. **Neuron**, 8, 631-642, 1992.
- PINHEIRO, F.V., VILLARINHO, J.G., SILVA, C.R., OLIVEIRA, S.M., PINHEIRO, K.V., PETRI, D., ROSSATO, M.F., GUERRA, G.P., TREVISAN, G., RUBIN, M.A., GEPPETTI, P., FERREIRA, J., ANDRÉ, E. The involvement of the TRPA1 receptor in a mouse of sympathetically maintained neuropathic pain. **European Journal of Pharmacology**, 747, 105-113, 2015.
- PROUDFOOT, C.J., GARRY, E.M., COTTRELL, D.F., ROSIE, R., ANDERSON, H., ROBERTSON, D.C., FLEETWOOD-WALKER, S.M., MITCHELL, R. Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. **Current Biology**, 16(16), 1591-1605, 2006.
- QUINTERO, GC. Advances in cortical modulation of pain. **J. Pain Res**, 6, 713-725, 2013.
- RO, L.S., CHANG, K. H. Neuropathic pain: Mechanisms and treatments. **Chang Gung Med J**, 28(9), 2005.
- ROHÁCS, T., LOPES, C.M.B., MICHAILIDIS, I., LOGOTHETIS, D.E. PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. **Nature Neuroscience**, 8(5), 626-634, 2005.
- RYCHKOV, G & BARRITT, G.J. TRPC1 Ca²⁺-Permeable channels in animal cells. In: FLOCKERZI, V., NILIUS, B. **Transient Receptor Potential (TRP) channels**. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2007. 23-52. Handbook of Experimental Pharmacology.
- SIMONETI, M., AGARWAL, N., STÖSSER, S., BALI, K.K., KARAUANOV, E., KAMBLE, R., POSPISILOVA, B., KUREJOVA, M., BIRCHMEIER, W., NIEHRS, C., HEPPENSTALL, P., KUNER, R. Wnt-TZD signaling sensitizes peripheral sensory neurons via distinct noncanonical pathways. **Neuron**, 83, 104-121, 2014.
- SMANI, T., SHAPOVALOV, G., SKRYMA, R., PREVARSKAYA, N., ROSADO, J.A. Functional and physiopathological implications of TRP channels. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1853, 1772-1782, 2015.
- SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR. Disponível em: <http://www.dor.org.br/brasil-sem-dor>. Acesso em: 03/06/2015.
- STAARF, S., OERTHER, S., LUCAS, G., MATTSON, J.P., ERNFORS, P. Differential regulation of TRP channels in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, 114, 187-199, 2009.
- STILLMAN, M. Clinical approach to patients with neuropathic pain. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, 73(8), 2006.

- STORY, G.M., PEIER, A.M., REEVE, A.J., EID, S.R., MOSBACHER, J., HRICIK, T.R., EARLEY, T.J., HERGARDEN, A.C., ANDERSSON, D.A., HWANG, S.W., MCINTYRE, P., JEGLA, T., BEVAN, S., PATAPOUTIAN, A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, 112(6), 819-829, 2003.
- STUCKY, C.I., DUBIN, A.E., JESKE, N.A., MALIN, S.A., MCKEMY, D.D., STORY, G.M. Roles of transient receptor potential channels in pain. **Brain Research Reviews**, 60, 2-23, 2009.
- SU, L., WANG, C., YU, Y.-H., REN, Y.-Y. XIE, R.-L., WANG, G.-L. Role of TRPM8 in dorsal root ganglia in nerve injury-induced chronic pain. **BMC Neuroscience**, 120(12), 2011.
- THAN, J. Y.-X.L., LI, L., HASAN, R., ZHANG, X. Excitation and modulation of TRPA1, TRPV1, and TRPM8 channel-expressing sensory neurons by the pruritogen chloroquine. **The Journal of Biological Chemistry**, 288(18), 12818-12827, 2013.
- TOMINAGA, M. & CATERINA, M.J. Thermosensation and pain. **Inc. J Neurobiol**, 61, 3-12, 2004.
- TREVISANI, G., ROSSATO, M.F., TONELLO, R., HOFFMEISNER, C., KLAFKE, J.Z., ROSA, F., PINHEIRO, K.V., PINHEIRO, F.V., BOLIGON, A.A., ATHAYDE, M.L., FERREIRA, J. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, 387, 679-689, 2014.
- TSAVALER, L., SHAPERO, M.H., MORKOWSKI, S., LAUS, R. *Trp-p8*, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares homology with transient receptor potential calcium channel proteins. **Cancer Research**, 61, 3760-3769, 2001.
- UPDIKE, J. The cold. In **More Matter: Essays and Criticism** New York: Ballantine Books, 1980, 133–138.
- VAN HECKE, O., TORRANCE, N., SMITH, B.H. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. **British Journal of Anaesthesia**, 111(1), 13-18, 2013.
- VOOLSTRA, O. & HUBER, A. Post-translational modifications of TRP channels. **Cells**, 3, 258-287, 2014.
- WANG, H. & WOOLF, C.J. Pain TRPs. **Neuron**, 46, 9-12, 2005.
- WASNER, G., SCHATTSCHNEIDER, J., BINDER, A., BARON, R. Topical menthol – a human model for cold pain activation and sensitization of C nociceptors. **Brain**, 127, 1159-1171, 2004.
- WEI, H., CHAPMAN, H., SAARNILEHTO, M., KUOKKANEN, K., KOIVISTO, A., PERTOVAARA, A. Roles of cutaneous versus spinal TRPA1 channels in mechanical hypersensitivity in the diabetic or mustard oil-treated non-diabetic rat. **Neuropharmacology**, 58, 578-584, 2010.
- WEI, H., HAMALAINEN, M.M., SAARNILEHTO, M., KOIVISTO, A., PERTOVAARA, A. Attenuation of Mechanical Hypersensitivity by an Antagonist of the TRPA1 Ion Channel in Diabetic Animals. **Anesthesiology**, 111, 147-154, 2009.

- WEI, H., VIISANEN, H., AMORIN, A., KOIVISTO, A., PERTOVAARA, A. Dissociated modulation of conditioned place-preference and mechanical hypersensitivity by a TRPA1 channel antagonist in peripheral neuropathy. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 104, 90-96, 2013A.
- WEI, H., SAARNILEHTO, M., FALCK, L., VIISANEN, H., LASIERRA, M., KOIVISTO, A., PERTOVAARA, A. Spinal Transient receptor potential ankyrin 1 channel induces mechanical hypersensitivity, increases cutaneous blood flow, and mediates the pronociceptive action of dynorphin A. **The Journal of Physiology and Pharmacology**, 64 (3), 331-340, 2013B.
- WERNER, M.F.P., KASSUYA, C.A.L., FERREIRA, J., ZAMPRONIO, A.R., CALIXTO, J.B., RAE, G.A. Peripheral kinin B₁ and B₂ receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. **Neuropharmacology**, 53, 48-57, 2007.
- WHY THINGS HURT. Lorimer Moseley. Adelaide: TEDx. Disponível em: <http://tedxtalks.ted.com/video/TEDx-Adelaide-Lorimer-Moseley-W>>. Acesso em: 03/06/2015.
- WIESKOPF, J.S., MATHUR, J., LIMAPICHAT, W., POST, M.R., AL-QAZZAZ, M., SORGE, R.E., MARTIN, L.J., ZAYKIN, D.V., SMITH, S.B., FREITAS, K., AUSTIN, J-B., DAI, F., ZHANG, J., MARCOVITZ, J., TUTTLE, A.H., SLEPIAN, P.M., CLARKE, S., DRENAN, R.M., JANES, J., AL SHARARI, S., SEGALL, S.K., AASVANG, E.K., WALKER, LAI, W., BITTNER, R., RICHARDS, C.I., SLADE, G.D., KEHLET, H., WALKER, J., MASKOS, U., CHANGEUX, J-P., DEVOR, M., MAIXNER, W., DIATCHENCKO, L., BELFER, I., GOUGHERTY, D.A., SU, A.I., LUMMIS, S.C.R., DAMAJ, M.I., LESTER, H.A., PATAPOUTIAN, A., MOGIL, J.S. The nicotinic $\alpha 6$ subunit gene determines variability in chronic pain sensitivity via cross-inhibition of P2X_{2/3} receptors. **Science Translational Medicine**, 7(287), 2015.
- XIE, W., STRONG, J.A., MEIJ, T.A., ZHANG, J.M., YU, L. Neuropathic pain: Early spontaneous afferent activity is the trigger. **Pain**, 116, 243-256, 2005.
- XING, H., CHEN, M., LING, J., TAN, W., GU, J.G. TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. **The Journal of Neuroscience**, 27, 50, 13680-13690, 2007.
- YOON, Y.W., SUNG, B., CHUNG, J.M. Nitric oxide mediates behavioral signs of neuropathic pain in an experimental rat model. **Neuroreport**, 9(3), 367-372, 1998.
- YUDIN, Y., ROHACS, T. Regulation of TRPM8 channel activity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 353, 68-74, 2012.
- ZAKHARIAN, E., CAO, C., ROHACS, T. Gating of Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) channels activated by cold and chemical agonists in planar lipid bilayers. **The Journal of Neuroscience**, 30(37), 12526-12534, 2010.
- ZENG, Z., INOUE, K., SUN, H., LENG, T., FENG, X., ZHU, L., XIONG, Z-G. TRPM7 regulates vascular endothelial cell adhesion and tube formation. **Am J Physiol Cell Physiol**, 308, C308-C318, 2015.

- ZHANG, X-B., JIANG, P., GONG, N., HU, X-L., FEI, D., XIONG, Z-Q., XU, L., XU, T-L. A-type GABA receptor as a central target of TRPM8 agonist menthol. **PLoS One**, 3(10), e3386-e3386, 2008.
- ZHENG, Z., INOUE, K., SUN, H., LENG, T., FENG, X., ZHU, L., XIONG, Z-G. TRPM7 regulates vascular endothelial cell adhesion and tube formation. **Am J Physiol Cell Physiol**, 308, C308-C318, 2015.